

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. D^r CALMETTE (A.), directeur de l'Institut Pasteur de Lille ;

CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur ;

D^r GRANCHER, professeur à la Faculté de médecine ;

D^r LAVERAN, membre de l'Institut de France ;

METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur ;

D^r ROUX, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;

D^r VAILLARD, médecin principal de l'armée.

TOME DIX-SEPTIÈME

1903

AVEC DIX-NEUF PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

MUSEUM D'HISTOIRE NATURELLE
LABORATOIRE
de PATHOLOGIE COMPARÉE

QR
1
A475
v.17
1903
PER

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

NOUVELLES RECHERCHES SUR L'ARSENIC DE L'ORGANISME

PRÉSENCE DE CE MÉTALLOÏDE DANS LA SÉRIE ANIMALE

PAR M. GABRIEL BERTRAND

A la suite des expériences que j'ai décrites, concernant la recherche de très petites quantités d'arsenic et l'existence normale de ce métalloïde dans l'organisme de plusieurs mammifères¹, il m'a paru nécessaire d'examiner si l'arsenic se rencontre aussi chez les autres animaux, de poursuivre cette recherche jusque chez les types les moins élevés en organisation.

Le problème se pose, en effet, de savoir si l'arsenic est un élément primordial de la cellule vivante, comme le carbone, l'azote, etc., ou bien s'il répond seulement au besoin d'une fonction particulière, apparue à un certain degré de perfectionnement de l'échelle animale.

Pour résoudre ce problème d'une manière satisfaisante et pouvoir tirer des nouvelles recherches tout l'enseignement qu'elles comportent, il était indispensable d'opérer dans des conditions aussi rigoureuses que possible, c'est-à-dire sur des animaux vivant dans un milieu normal, éloigné par conséquent de toutes ces causes de contamination qui résultent du contact plus ou moins direct avec l'industrie actuelle.

Les cétacés, certains oiseaux, des poissons et d'autres animaux qui fréquentent les abîmes de l'Océan présentent à ce point de vue les meilleures garanties. Ce sont eux que j'ai choisis et, grâce à la générosité de S. A. S. le prince de Monaco, ce sont eux que j'ai pu étudier.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVI, p. 553-561 (1902).

Toutes les captures, et même une partie des recherches chimiques (destruction des matières organiques, précipitation et mise en liberté du métalloïde) ont été effectuées au cours d'une croisière scientifique entreprise cette année, du 18 juillet au 17 septembre, à bord du yacht *Princesse-Alice*.

A l'exception d'un mouton, qui provient des pâturages du mont Pico, et de l'orque, harponnée par le prince en Méditerranée, les autres matériaux d'études ont été recueillis en plein Atlantique, quelquefois à 1,800 mètres de profondeur, dans une zone comprise entre Gibraltar, les Açores et l'ouverture de la Manche (exactement le banc de la Petite-Sole).

Bien entendu, on a pris les plus grandes précautions pour ne pas souiller les animaux. Les dissections ont été faites sur une table de bois et non, comme on en avait l'habitude à bord, sur des plateaux en zinc. Les pétrels ont été tués au fusil, mais, pour éviter l'erreur que pouvait apporter la présence du plomb de chasse, toujours arsenical, on a rejeté le corps de ces oiseaux et utilisé seulement les plumes, séparées avec soin aussitôt après la mort. Les actinies, les étoiles de mer, les seiches et autres animaux provenant des fonds ont été lavés complètement à l'eau de mer, afin de détacher les dernières particules sableuses qui pouvaient y adhérer. Dans le cas des étoiles de mer et des oursins, plus difficiles à nettoyer à cause des nombreux tentacules et des pointes qui hérissent leur surface, on a prélevé un échantillon du fond sableux sur lequel on les avait dragués, et on y a cherché l'arsenic en opérant comme s'il s'était agi des animaux eux-mêmes.

Cet échantillon, desséché, pesait 38 grammes. Il était formé presque entièrement de squelettes calcaires de globigérines. Attaqué par 73 grammes d'acide nitrique et 65 grammes d'acide sulfurique, il n'a donné qu'une trace douteuse d'arsenic. Les quelques grains qui pouvaient rester après le corps des animaux ne peuvent donc être considérés comme une cause d'erreur.

Il aurait pu en être autrement si on avait eu affaire à certains fonds d'origine volcanique. C'est ainsi que 16 grammes de sable et de petits cailloux, ramenés d'une profondeur de 1,187 mètres, près de l'île São Miguel, ont fourni un anneau arsenical d'environ 4 à 5 millièmes de milligramme. Les actinies, pêchées sur ce fond, dont la nature volcanique était évidente,

ont été fendues et nettoyées minutieusement, de manière à ne plus présenter trace de matières étrangères.

Remarquons qu'il eût fallu un nettoyage vraiment grossier de ces actinies pour y laisser 1 gramme et demi de sable ou petits cailloux correspondant à la plus petite quantité d'arsenic décelable par mon procédé de recherche. De sorte qu'on ne peut, ici non plus, faire valoir la présence de particules venant du fond dans le corps des animaux contre le résultat de l'analyse.

Mais il ne suffisait pas de recueillir et de préparer les échantillons dans des conditions aussi rigoureuses; il fallait encore pouvoir les conserver et les analyser à l'aide de produits et de réactifs bien exempts d'arsenic.

Chaque fois qu'on n'a pas expérimenté sur des matériaux frais, c'est l'alcool qui a servi d'agent conservateur. On en possédait une provision dont un litre avait permis de vérifier la pureté absolue au point de vue qui nous occupe. Les animaux ou parties d'animaux étaient placés dans environ leur poids de cet alcool, au titre de 96°. Au moment des analyses, on pesait à nouveau le liquide et la partie solide, et on opérait sur un mélange de portions aliquotes.

Quant aux réactifs, ils étaient encore plus purs que ceux employés au cours de mes précédentes recherches. C'est ainsi que 300 grammes d'acide azotique étaient nécessaires pour donner, avec 30 grammes d'acide sulfurique et 25 grammes de zinc, un anneau arsenical de $\frac{1}{2}$ millième de milligramme, c'est-à-dire pour atteindre la limite de sensibilité de la méthode, telle que je l'ai modifiée. Dans aucune expérience, d'ailleurs, on n'a employé une aussi grande quantité de réactifs pour rechercher l'arsenic.

Il était avantageux, en effet, au point de vue de la précision, de limiter autant que possible la quantité des réactifs mis en jeu dans chaque expérience. J'ai réalisé cette condition, aussi bien en ce qui concerne l'attaque de la matière organique que la séparation de l'arsenic dans l'appareil de Marsh.

En prenant un mélange de 1 partie d'acide sulfurique avec 9 d'acide azotique, et en ajoutant encore aux organes, suivant les cas, une plus ou moins grande quantité d'acide sulfurique pur, on peut arriver aisément à libérer l'arsenic avec un poids de

réactifs ne dépassant guère $1/2$ à 3 fois celui de la matière sèche.

Certains animaux ou organes, riches en composés calcaires, exigent toutefois un supplément d'acide sulfurique, destiné à la transformation du calcium en sulfate.

Si l'on prend, par exemple, comme cela a été le cas le plus fréquent, des tissus mous (thyroïde d'orque, muscle de grondin, testicule de squal, holothurie, etc.), ou même des plumes de pétrel, de la corne de mouton ou de l'écaille de tortue, on procède la manière suivante :

Le tissu, frais ou au sortir de l'alcool, est d'abord divisé en petits fragments à l'aide de ciseaux. S'il y a lieu, le liquide alcoolique dans lequel il était conservé est évaporé à sec au bain-marie ; on opère alors cette évaporation dans la capsule où se fera l'attaque. La corne et l'écaille doivent être réduits en poudre fine dans un mortier, le mieux après dessiccation à l'étuve. L'échantillon ainsi préparé est pesé ; on évalue, soit par un calcul approximatif, soit par chauffage à l'étuve d'une portion aliquote, ce qu'il renferme de matière sèche, et on le met dans une capsule de porcelaine spacieuse avec une quantité du mélange acide correspondant à 1 ou 2 fois le poids de la matière sèche. On ajoute à ce mélange encore un peu d'acide sulfurique, à peu près 20 à 25 0/0 du poids sec, et on chauffe doucement. On peut commencer ce chauffage au bain-marie, surtout si le tissu est imbibé d'alcool, mais il faut le continuer sur un fourneau à gaz ou à pétrole, recouvert d'une toile métallique et d'un large disque de métal, perforé au centre. On peut ainsi pousser le feu à la fin de l'opération, sans courir le risque de surchauffer les bords de la capsule.

Pendant le chauffage, il faut agiter continuellement le mélange en réaction qui doit rester très homogène. La dissolution se fait rapidement ; on obtient une masse visqueuse, jaune clair d'abord, puis jaune foncé, plus fluide, se caramélisant enfin.

En opérant comme je l'indique, c'est-à-dire avec un mélange assez riche en acide sulfurique, on n'a pas à craindre cette espèce de déflagration qui arrive quelquefois dans le procédé habituel de M. Arm. Gautier. La décomposition de la matière organique se poursuit régulièrement jusqu'à la fin. On augmente un peu le feu quand le mélange brunit, et l'on chauffe,

toujours en agitant, jusqu'à ce que la masse soit tout à fait noire et homogène¹. En général, on n'obtient pas le résultat indiqué du premier coup; il faut rajouter encore du mélange acide et évaporer de nouveau. Quand on a un peu d'habitude, on voit très bien, au cours de l'opération, qu'on n'arrivera pas au but sans une nouvelle addition de réactifs; on verse alors le mélange acide avec une pipette, peu à peu, tout en remuant et en poursuivant l'évaporation. Lorsque l'attaque est terminée, la masse restant dans la capsule ressemble à du cirage²; si on en met un peu dans l'eau froide, elle se divise facilement en fines particules et le liquide se colore à peine en jaune.

On éteint le feu, on projette goutte à goutte de l'eau froide sur le résidu noir, puis, à la fin, une plus forte quantité d'eau; 1/4 de litre, par exemple. On délaye bien la masse et, après refroidissement complet, on sépare les produits humiques insolubles par filtration. Le liquide, réuni aux eaux de lavage du précipité, est alors soumis à l'action de l'acide sulfureux et du gaz sulfhydrique, suivant la méthode connue.

Avec les éponges, les astéries, les écailles de poisson, il faut augmenter, au début, la dose additionnelle d'acide sulfurique pur, à cause de leur richesse en combinaisons calcaires.

Les oursins ont été traités avec leurs carapaces de carbonate de calcium; on a donc modifié un peu le début de l'opération, pour ne pas être gêné à la fin par une forte proportion de nitrate, qui aurait provoqué l'inflammation du mélange.

Cent grammes d'oursins (sortant de l'alcool) et représentant 26^{gr},8 de matière sèche, ont été placés dans une capsule avec l'extrait sec, soit 3^{gr},6, provenant des 110 grammes de liquide dans lequel ils baignaient. On a ajouté peu à peu le mélange acide, en opérant au bain-marie, jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne produisit plus d'effervescence sensible. A ce moment, la craie étant saturée, on avait employé 36 grammes de mélange, soit 32^{gr},4 (les 9/10) d'acide azotique. Ces 32^{gr},4 correspondent à peu près à 25 grammes d'acide sulfurique pur; on en a ajouté 30: tout le calcium qui se trouvait sous forme de nitrate s'est transformé en sulfate, de sorte que le contenu de la cap-

1. Avec l'éponge, les écailles de poissons, elle était sèche et pulvérulente.

2. La plus haute température qu'on doive atteindre est celle à laquelle commencent à se dégager quelques vapeurs blanches (vapeurs d'acides gras principalement).

sule renfermait finalement $32^{\text{gr}},4$ d'acide zoatique et $5 + 3,6$, = $8^{\text{gr}},6$ d'acide sulfurique. L'attaque a été terminée comme les précédentes.

Je suis parvenu aussi à limiter beaucoup le poids des réactifs, zinc et acide sulfurique, nécessaires à la conduite de l'appareil de Marsh. Le poids de zinc, platiné d'avance et lavé, est de 15 à 20 grammes par opération. Sur ce poids, il ne s'en dissout guère que $2\frac{1}{2}$ à 3 grammes. La quantité d'acide sulfurique dépasse rarement 6 grammes. J'en verse d'abord 2 étendus au $\frac{1}{5}$, pour chasser l'acide carbonique. Après un quart d'heure et derrière la solution arsenicale, j'en ajoute un troisième, dilué de 9 parties d'eau; puis, après $\frac{1}{2}$ heure environ, je fais une seconde addition d'un gramme au $\frac{1}{10}$: enfin, après 1 heure, 2 grammes d'acide au $\frac{1}{5}$ complètent et même au delà la dose exigée pour le dégagement de tout l'arsenic à l'état d'hydrure.

L'acide est toujours versé par l'intermédiaire d'un entonnoir à robinet, de manière à pouvoir régler le dégagement gazeux. Au commencement, lorsqu'on déplace l'acide carbonique, on cherche à gagner du temps et l'on verse presque d'un seul coup la première dose d'acide; mais à partir du moment où la solution arsenicale pénètre dans l'appareil, il faut régler la vitesse de production de l'hydrogène entre 4 et 10 c. c. au plus par minute.

Les expériences d'isolement de l'arsenic que j'ai faites pendant la croisière ont surtout servi à m'orienter au milieu de mes recherches. Malgré une installation vraiment remarquable, on ne pouvait compter, en effet, travailler sur le navire comme dans un laboratoire. Le climat chaud et humide, le mouvement du roulis rendaient les manipulations très fatigantes, quelquefois même impossibles. Les opérations de pêche et de chasse, indispensables pour se procurer les matériaux d'études, causaient à leur tour de nouvelles interruptions. Enfin, les attaques de matières organiques étant effectuées sur le pont, il était impossible, malgré les dispositions prises, d'éviter tout à fait l'influence du vent; l'entraînement des gaz chauds et quelques extinctions portaient la durée d'une attaque à 2 ou 3 heures, pendant lesquelles il fallait toujours craindre l'introduction de poussières, notamment celles de la cheminée, dans le mélange en réaction. Pour ces diverses causes, on n'a exécuté, durant la croisière, qu'un nombre assez restreint d'expériences

qui, toutes, ont été reproduites au retour, à l'Institut Pasteur. Les unes comme les autres ont donné d'ailleurs les mêmes résultats.

Les animaux sur lesquels ont porté les recherches ont été les suivants :

Éponge (*Desmacidon fruticosa* [Montagut], Bowerbank)¹. Les individus de cette espèce, du type corné, viennent du banc de la Petite Sole (9°4 long. ouest. et 48°4 lat. nord), à 150 mètres de profondeur. On les a lavés complètement à l'eau de mer, passés dans l'eau douce et fortement pressés à la main. A cet état, ils pesaient 1,365 grammes et renfermaient 8,90 0/0 de matière sèche.

Actinie (*Chitonactis Richardi*, Marion). Deux individus pêchés à 1,187 mètres, près de l'île São Miguel. Poids : 105 grammes; matière sèche : 12,48 0/0.

Étoile de mer (*Pedicellaster sexradiatus*, Perrier)². Nombreux individus ramenés de 1805 mètres de profondeur avec le chalut, au voisinage de l'île Terceira. Matière sèche : 24,16 0/0.

Oursin (*Strongylocentrotus Dröbachiensis*, Agassiz). Proviennent aussi en grand nombre de la même station que les étoiles de mer. La matière sèche n'a pas été dosée par rapport aux animaux frais.

Holothurie (*Stichopus regalis*, Cuvier) du banc de la Petite-Sole. Matière sèche : 4,62 0/0.

Anatifes (*Lepas anatifera*, Linné). Développés sur une pièce de bois équarrie, flottant au voisinage du banc Chauser (43° lat. nord et 31°5 long. O). On a utilisé seulement les parties molles (pieds, cirrhes, etc.), dans lesquelles on a dosé 10,99 0/0 de matière sèche.

Seiches (*Sepia officinalis*, Linné). Ramenées dans le chalut en même temps que les holothuries. Elles étaient de petite taille. 14 individus, lavés et égouttés, pesaient 813 grammes. On y a dosé 35 grammes d'os et 134^{gr},6 de matière sèche.

Roussettes (*Scyllium canicula*, Cuvier). Pêchées au banc de la Petite-Sole. Après un lavage soigné, on a enlevé les peaux qui seules ont été conservées dans l'alcool et analysées. Elles contenaient 50,4 0/0 de matière sèche.

1. Détermination de M. Topsent.

2. Presque toutes ces espèces ont été déterminées par M. Jules Richard.

Germons (*Thunnus alalunga*, Gmelin). Pris à la ligne de traîne, en plein Atlantique. On a prélevé 135 grammes de peau sur deux poissons de 4 à 5 kilogrammes chacun.

Serrans (*Serranus atricauda*, Günther). Pêchés sur le banc Guettysburg. On avait mis à part des écailles, de la peau entière et des muscles. Matière sèche dans la peau : 44,4 0/0; dans les muscles : 34,2 0/0.

Grondins (*Trigla pini*, Bloch). Pris au chalut sur le banc de la Petite-Sole. On a séparé la peau de 30 individus et conservé aussi une certaine quantité de muscles. Matière sèche dans la peau : 42,4 0/0; dans les muscles : 22,6.

Squale (*Ceutrocygnurus caelolepis*, Boc.). Pris au palancre, à 1095 mètres de profondeur, au nord de l'île São Jorge. Les testicules frais pesaient 105 grammes; matière sèche : 12,5 0/0.

Tortue de mer (*Thalassochelys caretta*, Linné). Capturée au large des Açores. La carapace a été mise à part. En s'aidant de la scie, de la pince et du pilon, on a séparé les écailles du squelette et on les a réduites en poudre pour l'analyse.

Pétrels (*Procellaria pelagica*, Linné). Neuf de ces oiseaux tirés en haute mer ont fourni 34 grammes de plumes, y compris les becs et les ongles.

Orque (*Orca gladiator*, Linné). Capturée en Méditerranée, près de Gibraltar. Les glandes thyroïdes fraîches pesaient 195 grammes. On n'a fait qu'une seule expérience sur 50 grammes. La peau a été examinée au laboratoire, sur des échantillons conservés dans l'alcool. On avait mis à part une partie de l'épiderme.

Mouton (*Ovis aries*, Linné). Provient des pâturages du mont Pico, à 1500 mètres d'altitude. Ils s'était tué en tombant dans une crevasse. On a étudié seulement les cornes, séparées de leur partie osseuse et pulvérisées au mortier.

Le tableau ci-après résume les résultats obtenus.

Comme on le voit par ces résultats, tous les animaux examinés, depuis les vertébrés supérieurs jusqu'aux spongiaires, renferment de petites quantités d'arsenic.

La présence de ce métalloïde n'est pas, comme celle d'autres éléments, en quelque sorte caractéristique de certains groupes d'êtres. Tandis que l'acte respiratoire, par exemple, s'accomplit avec le concours du cuivre chez des crustacés et des mollusques,

Noms des espèces.	Organes examinés.	Poids de matière sèche soumis à l'expérience.	Poids des acides employés dans l'attaque		Arsenic trouvé en milligrammes.
			azotique	sulfurique	
Eponge.....	entière	36,7	67,5	17,5	0,005
Actinie.....	entière	13,1	18	7	0,002
Etoile de mer.	entière	29,0	10,5	19,5	0,002
Oursin.....	entière	30,4	32,5	33,5	0,0045
Holothurie....	entière	81,8	72	15	0,003
Anatife.....	moins les valves calcaires	31,5	147	26	0,002
Seiche.....	moins l'os testicules	40,8	81	14	0,002
Squale.....	peau	12,5	16	7	0,0015
Roussette.....	peau	24,7	45	15	0,0025 à 0,003
Germon.....	peau	26,0	180	40	0,0035 à 0,004
Grondin.....	peau	32,7	36	14	0,005
—	muscle	30,1	71	14	0,0015
Serran.....	peau	22,2	45	12	0,001
—	muscle	47,1	33	8	0,001
—	écailles	environ 20	»	»	0,001
Tortue de mer.	écailles	20	40,5	9,5	0,0035
Pétrel.....	plumes	34	43	15	0,0025
Orque.....	corne	50 (à l'état frais)	45	10	0,0025
—	épiderme	40	86,5	19,5	0,0035
—	peau	14,4	36	9	0,002
Mouton.....	glande thyroïde.	20	50,5	10,5	0,004

avec celui du fer chez les vertébrés, la différenciation morphologique et fonctionnelle s'est poursuivie d'un bout à l'autre de l'échelle animale, sans s'accompagner, en ce qui concerne l'arsenic, d'aucune différenciation chimique élémentaire.

Il ressort, en outre, des résultats que je viens de publier et de ceux que j'ai communiqués antérieurement, qu'au lieu d'être localisé dans certains organes, l'arsenic se retrouve au contraire dans tous les tissus.

On sait qu'à l'aide de sa méthode de recherche, M. Arm. Gautier était arrivé à la conviction que la glande thyroïde est l'organe le plus riche en arsenic, celui qui renferme, pour ainsi dire, la provision arsenicale de l'individu. M. Arm. Gautier avait trouvé aussi une quantité notable d'arsenic dans la glande mammaire, beaucoup moins dans le cerveau et le thymus, enfin des traces seulement dans la peau et ses annexes (par exemple, un peu moins de 1/20^e de milligramme dans 150 grammes de corne de bœuf). M. Arm. Gautier n'a pu en déceler, par contre, ni dans le foie, ni dans les muscles, ni dans les testicules¹. Ma méthode, environ dix fois plus sensible et en même temps plus

1. *Comptes rendus Ac. d. Sciences*, t. CXXX, p. 284-291, 1900.

précise¹, montre que ces derniers tissus renferment eux-mêmes une certaine proportion du métalloïde².

Ainsi, l'arsenic existerait dans toutes les cellules vivantes; il serait, au même titre que le carbone, l'azote, le soufre ou le phosphore, un élément fondamental du protoplasma³.

Cette conclusion comporte des conséquences importantes. La nature et les transformations réciproques des combinaisons arsenicales de l'organisme devront maintenant préoccuper les chimistes; leur rôle à l'état de santé et de maladie devra faire l'objet de nouvelles études de la part des physiologistes et des médecins. La thérapeutique et jusqu'à l'agriculture devront ressentir l'utile contre-coup des résultats acquis dans ces directions. Enfin, la médecine légale voit s'éclairer un des points les plus obscurs de son domaine, celui sur lequel ont eu lieu le plus de discussions.

M. Arm. Gautier a établi, comme on l'a vu plus haut, qu'une petite quantité d'arsenic existe, chez l'homme, dans la glande thyroïde, qu'il y en a aussi des traces dans le cerveau, dans la peau et ses annexes⁴. Cette découverte, contredite par divers savants⁵, se trouve aujourd'hui non seulement appuyée par des faits d'une signification très générale, mais encore étendue à tous les tissus de l'économie. On peut dire que de petites quantités d'arsenic isolées du corps, même du tube digestif, du foie ou des muscles, peuvent avoir une origine exclusivement normale. On devra donc toujours, soit au cas de recherches sur la diffusion ou la répartition de l'arsenic, entreprises dans un but médical ou autres, soit au cas d'expertises médico-légales, baser les conclusions sur des dosages du métalloïde, et non pas, comme on l'a malheureusement fait dans quelques circonstances, se contenter de simples recherches qualitatives.

1. Une description détaillée de cette méthode paraîtra prochainement dans les *Annales de Chimie et de Physique*.

2. A ce sujet, il est intéressant de remarquer que l'éponge, supprimée de la thérapeutique moderne, mais qui servait autrefois à combattre diverses affections, et notamment le goître, trouve une nouvelle justification de son emploi dans les résultats exprimés plus haut. Non seulement, en effet, l'éponge contient de l'iode en quantité importante, mais encore cet autre principe essentiel de la glande thyroïde, l'arsenic, dans une proportion qui n'est atteinte par aucun autre animal.

3. Les animaux se nourrissant tous, directement ou indirectement, de végétaux, ces derniers doivent renfermer de l'arsenic.

4. *Loc. cit.*

5. HOEPLMOSER, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1901, t. XXXIII, p. 329-344; ZIEMKE, *Apotheker Zeitung*, 1902, t. XVII, et CERNY, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1902, p. 408-416.

QUELQUES NOUVELLES RACES DE LEVURES DE LACTOSE

PAR P. MAZÉ

Le lactose a été rangé pendant longtemps parmi les sucres susceptibles de se dédoubler en alcool et acide carbonique sous l'influence des levures ; mais une étude approfondie des propriétés des levures ordinaires a conduit peu à peu à cette conclusion que le lactose était réfractaire à leur action. Partout où on avait cru observer une fermentation alcoolique du lactose, on n'aurait dû relever qu'une fermentation de ses composants, le glucose et le galactose, mis en liberté par la lactase sécrétée par des microbes qui se développent à côté des levures.

M. Duclaux ¹ a rencontré, le premier, une levure de lactose dans un lait qui fermentait comme du moût ensemencé avec des *saccharomyces*. Plus tard, M. Adametz ², d'abord, et M. Kayser ³, ensuite, en ont découvert deux autres jouissant également de la propriété de faire fermenter le lactose. Ces trois levures ont été l'objet d'études suivies.

Quelques auteurs en ont signalé d'autres, en particulier, MM. Weigman ⁴, Boccichio ⁵, Jorgensen ⁶, Freudenreich et Jensen ⁷ ; elles ont été rencontrées dans le fromage, l'*aisy* ou le beurre ; mais elles n'ont pas été identifiées avec les 3 précédentes, et l'on se demande même si elles étaient toutes de véritables levures de lactose ⁸.

Le milieu qui semble le mieux qualifié pour héberger de pareilles levures est certainement le lait : mais si on essaye de les y découvrir, on remarque tout de suite qu'en fait de *saccharomyces*, on n'y rencontre que des levures ordinaires. Ce résultat s'explique de lui-même : les levures ordinaires passent inaper-

1. *Ces Annales*, t. I, p. 573.

2. *Centralb. f. Bakt.* 1889, t. V, p. 116.

3. *Ces Annales*, t. V, 1891, p. 395.

4. *Milchzeitung*, 1890, n° 38, p. 743.

5. *Annales de Micrographie*, t. VI, 1894.

6. *Mikroorg. d. Gahrungsind.* 1898.

7. *Centralblatt für Bakt.*, 1897, 2^e, p. 552, et O. Jensen, *Annuaire agricole de la Suisse*, 1901, 9^e fasc., p. 344.

8. La *torula amara* isolé, par M. Harrisson, du lait amer est également un ferment alcoolique du lactose. *Revue générale du lait*, n° 20, p. 137.

gues dans le lait, tandis que celles qui sont capables de faire fermenter le lactose se signalent par un dégagement abondant d'acide carbonique et par un changement rapide dans la saveur du lait, très sensibles déjà avant 48 heures de conservation. On s'applique donc à les éliminer dès qu'elles révèlent leur présence, et comme leur destruction est chose facile, on ne les rencontre qu'accidentellement dans le lait, et en conséquence dans le beurre.

Pour les trouver, il faut s'adresser à des fromages à pâte molle, parce que ceux-ci ne subissent qu'un chauffage très modéré au moment de l'emprésurage, incapable par conséquent de tuer les germes que le lait peut rencontrer dans les fromageries; et si le lait ne s'ensemence pas spontanément avant l'emprésurage, les fromages égouttés sont susceptibles de servir de réceptacles aux levures de lactose, en raison de leur consistance, qui n'offre aucune barrière à la pénétration de celles qui sont répandues sur les appareils de la fromagerie.

Comme j'ai eu l'occasion d'étudier la flore microbienne d'un certain nombre de variétés de fromages, je me suis attaché à vérifier si le monde des levures de lactose n'est pas, en réalité, plus peuplé que ne l'indiquent les renseignements qu'on possède, jusqu'à présent, sur lui.

L'expérience a montré, tout de suite, que cette supposition est justifiée. J'ai isolé, avec le concours de MM. Perrier et Guérault, 11 espèces différentes de levures de lactose tirées de diverses variétés de fromages.

Voici les fromages que j'ai examinés avec le nombre de levures de lactose que j'en ai retirées.

TABLEAU I

Fromages.	Nombre de levures.	Nos
Camembert.	2	1-2
Brie.	0	»
Coulommiers (double crème).	2	3-4
Port-du-Salut.	1	5
Pont-l'Evêque.	1	6
Bonde de Neufchâtel.	1	7
Munster.	2	8-9
Livarot.	1	10
Emmenthal.	0	»
Mont-d'Or.	1	11
Saint-Nectaire.	0	»
Tome de Savoie.	0	»
Reblochon.	0	»

A côté de ces levures, il y a partout des levures ordinaires, sauf dans l'Emmenthal; comme je n'ai examiné qu'un seul échantillon de chaque variété de fromage, les renseignements du tableau précédent ne sauraient être invoqués en faveur de la présence constante ou de l'absence complète des levures de lactose dans une variété donnée de fromage; ce qui le prouve, c'est que M. Perrier, en examinant un deuxième échantillon de Brie, en a trouvé une autre que je ne fais pas figurer ici.

Ces levures ne tiennent pas une grande place dans la flore des fromages. Pour les mettre en évidence, j'ai ensemencé de petits fragments de pâte, de la grosseur d'une tête d'épingle, dans un bouillon organique légèrement acidulé et additionné de saccharose qui s'intervertissait par la stérilisation.

Dans ce milieu, ce sont les ferments lactiques qui se développent les premiers; puis les moisissures, les mycodermes, les oïdiums apparaissent et ne tardent pas à provoquer un léger dégagement de gaz.

La levure, moins prolifique, ou plus difficile à rajeunir, ne se montre en abondance que bien plus tard, et quelquefois on est obligé de faire un deuxième passage dans le même milieu en prenant la semence au fond du tube où les rares globules présents se réunissent de préférence. La prise de possession du milieu se signale par une fermentation active, laquelle se révèle au moindre choc imprimé aux tubes par une effervescence tumultueuse.

C'est à ce moment qu'on isole sur gélose, et toutes les espèces de levures ou de formes-levures obtenues sont ensemencées directement dans le lait. Celui-ci devient le siège d'une fermentation active au bout de 48 heures si la levure ensemencée fait fermenter le lactose.

Pour mettre en évidence les caractères distinctifs de ces levures, j'ai utilisé un milieu formé de parties égales de bouillon Martin et d'une solution de lactose additionné de 1 0/00 de phosphate d'ammoniaque.

On alcalinise avec du carbonate de sodium ou on acidifie avec de l'acide lactique, suivant les observations que l'on se propose de faire.

Le choix de ce milieu se justifie par les raisons suivantes : d'abord on ne peut songer à un milieu minéral, lorsqu'il s'agit

d'échelonner le plus possible les propriétés physiologiques de 11 levures.

Parmi les milieux organiques, c'est le petit-lait qui est tout désigné; on peut se le procurer facilement ou, à la rigueur, le préparer soi-même; mais rien ne prouve qu'il soit le meilleur, car la plupart des levures isolées proviennent de fromages où elles trouvent non seulement de la caséine mais encore une grande quantité de ses produits de dégradation, jusque, et y compris l'ammoniaque; de plus, on n'est jamais sûr d'avance de le rencontrer dans le commerce absolument exempt de lactose interverti, car la plupart des manipulations auxquelles on le soumet, dans un but de conservation, tendent à dédoubler le lactose en raison de la présence d'acide lactique. La présence de glucose ou de galactose libres est un inconvénient sérieux, parce que ces sucres favorisent la multiplication de la levure, et peuvent la rendre capable d'agir sur le lactose en vertu d'une action de masse.

Avec le bouillon Martin, préparé de façon à éliminer aussi bien que possible de la viande le glycogène et ses dérivés, on ne se heurte pas à la même difficulté, et si l'on remarque qu'il est très riche en matières azotées solubles, au nombre desquelles les levures trouveront la plupart des composés qu'elles rencontrent dans la caséine plus ou moins complètement digérée, on peut admettre que, modifié comme je l'ai indiqué, il réunit les meilleures conditions propres à faciliter l'étude que je me propose de faire.

Le milieu ainsi obtenu est stérilisé par filtration à travers une bougie Chamberland, afin d'éviter toute trace d'intervention du lactose.

Additionné de 10 0/0 de lactose commercial pur, exempt de lactose interverti et renfermant un peu plus de 90 0/0 de lactose, il a servi à faire 2 essais de fermentation: l'un en milieu alcalin, l'autre en milieu acide. Le taux de l'alcalinité, évalué en NaOH, est 0,3 0 00; l'acidité obtenue par addition d'acide lactique est de 0,773 0 00. La réaction est évaluée au tournesol d'orcine. Les cultures ont été faites dans des fioles de 150 c. c. qui recevaient chacune environ 100 c. c. de bouillon.

Les résultats obtenus sont résumés dans les 2 tableaux suivants.

TABLEAU II

MILIEU ACIDE

Levures	Etat de la fermentation.	Acidité totale 0/00 en SO^4H^2 .	Alcool 0/0 en volume.
1	finie	1,260	4,625
2	—	1,349	4,93
3	—	1,205	4,93
4	inachevée	1,101	3,33
5	finie	1,550	4,58
6	—	1,091	4,30
7	—	1,406	4,5
8	—	1,473	3,44
9	—	1,091	2,50
10	inachevée	1,359	4,30
11	—	1,244	3,88
a ¹	—	1,091	4,375
b	finie	1,241	4,44
c	inachevée	1,397	3,66

TABLEAU III

MILIEU ALCALIN

	»	»	»
1	—	—	—
2	finie	0,680	4,55
3	—	0,765	4,562
4	—	0,861	4,25
5	—	0,861	4,625
6	—	0,688	4,75
7	—	0,785	4,137
8	—	0,918	4,375
9	—	1,014	3,666
10	—	0,669	4,50
11	—	0,851	4,1

La durée des expériences en milieu acide est de 11 jours à 26°; en milieu alcalin, les levures sont restées d'abord 6 jours à la température du laboratoire, 18-20°, et 6 jours à 26°; on voit donc que la fermentation est plus rapide dans les milieux alcalins, puisqu'elle est achevée partout en 12 jours, tandis que dans les milieux acides elle n'est pas terminée complètement en 11 jours avec un certain nombre de levures. Ceci semble indiquer que les levures de lactose, habituées à un milieu qui ne tarde pas à

1. Les levures *a*, *b*, *c*, désignent respectivement les levures : Duclaux, Adametz, Kayser.

devenir alcalin, préfèrent les milieux alcalins, ainsi que le prouvent d'ailleurs une production plus grande d'acidité et un rendement en alcool en général plus élevé.

Les levures *a*, *b*, *c* se sont montrées également très actives, plus actives dans ce milieu que dans ceux que les auteurs leur avaient offerts, et l'on voit ainsi que, d'une manière générale, toutes ces levures de lactose présentent les mêmes caractères, en ce qui concerne la production d'acides et d'alcool surtout en milieu alcalin.

Mais quelques-unes semblent se rapprocher du rendement théorique, ce qui veut dire que la quantité de lactose fournie est un peu faible; il est probable que beaucoup d'entre elles sont capables de pousser plus loin l'enrichissement du milieu en alcool, si on leur offre une plus grande quantité de lactose; c'est un moyen d'exagérer les caractères distinctifs de ces levures, et suivant les indications des tableaux II et III, on réussira encore mieux dans cette voie en leur fournissant un milieu acide.

J'ai donc repris ces essais; l'acidité au départ était de 0,8 0/00, le bouillon a été réparti dans des fioles de 250 c. c. à raison de 150 c. c. par fiole; il renfermait 15 0/0 de lactose commercial, en réalité, 13,5 à 14 0/0 de lactose pur. La semence a été empruntée à des fermentations en pleine activité, dans le même milieu acidulé à 2 0/00; chaque fiole a reçu 1 c. c. de semence.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Levures.	Durée et état de la fermentation.	Acidité totale en SO^3H^2 .	Alcool 0/0 en volume.	Observations.
1	14 jours; achevée	1,118	7,875	Les cultures ont été arrêtées à mesure qu'on constatait la fin de la fermenta- tion, les levures 5 et 6 seules présentaient en- core une très légère fermenta- tion.
2	11 —	1,201	5,25	
3	11 —	1,305	4,25	
4	11 —	1,159	4,	
5	16 inachevée	1,387	5,41	
6	11 achevée	1,066	5,	
7	11 —	1,118	3,775	
8	13 —	1,097	4,375	
9	10 —	1,097	3,	
10	11 —	1,284	5,06	
11	11 —	1,190	4,775	
<i>a</i>	11 —	1,263	4,875	
<i>b</i>	16 inachevée	1,408	6,142	
<i>c</i>	14 achevée	1,263	4,56	

Les chiffres qui expriment la teneur en alcool des liquides de cultures varient du simple au double : on voit ainsi les différences entre ces diverses levures s'accroître de plus en plus ; 2 levures ont produit moins d'alcool en milieu riche en lactose qu'en milieu à 10 0/0 : ce sont les levures 3 et 7 ; cela résulte de la comparaison des chiffres des tableaux II et IV ; les autres en fournissent davantage.

* * *

Mais la comparaison de ces chiffres, considérés tels quels, ne nous donne pas une notion bien nette de l'activité de ces diverses levures ; les quantités d'alcool trouvées ont été produites en effet par des poids variables de levures ; on aura donc des renseignements plus exacts sur cette activité, en ramenant les quantités d'alcool obtenu à l'unité de poids de levure ; cependant, il ne faut pas accorder non plus à ces chiffres ainsi calculés plus de valeur qu'ils ne sauraient avoir. L'activité d'une levure se mesure par la quantité de zymase qu'elle peut mettre en jeu ; cette zymase se conserve ou se détruit sous une foule d'influences qui sont loin d'être identiques d'une levure à l'autre, d'une culture à l'autre.

Le tableau V renferme les éléments des calculs en question et les résultats qu'ils ont fourni. La colonne intitulée *pouvoir ferment.*, expression employée comme on voit dans un sens particulier, renferme le poids d'alcool fourni par l'unité de poids de levure.

TABLEAU V

Levures.	Poids de levure calculé 0/0 c. c. de liquide de culture.	Alcool en poids dans 100 c. c. de liquide de culture.	Pouvoir ferment.
	mgr.	mgr.	
1	130,6	4700	35,9
2	296,6	4200	14,1
3	189,	3400	17,9
4	196,7	3200	16,2
5	148,2	4352	29,3
6	238,6	4000	16,7
7	265,4	3020	11,3
8	184,4	3500	19,
9	196,7	2400	12,2
10	272,5	4050	14,8
11	250,2	3820	15,2
a	111,5	4913	34,9
b	151,9	3900	32,3
c	»	3648	»
			2

Le pouvoir ferment. délini de la sorte, n'est pas, comme on peut s'en rendre compte, bien élevé chez les levures de lactose; mais par contre, le poids de levurè récolté est assez élevé; cela tient à la nature du bouillon, et aussi à la lenteur de la fermentation qui permet une aération relative du milieu de culture, pendant toute la durée des expériences.

J'ai déterminé en outre, dans les liquides fermentes, la nature et la quantité des sucres restants; j'ai employé pour cela la méthode ordinaire, basée sur la recherche des pouvoirs rotatoires et réducteurs des solutions avant et après interversion: le lactose, on le sait, est plus résistant que ses isomères à l'action des acides dilués. Pour obtenir une interversion complète, j'ai traité les liqueurs par 1,5 à 0, en volume, d'acide chlorhydrique concentré, à la température de 120° pendant 3 heures, après avoir vérifié préalablement que des solutions à 10 à 0 de lactose étaient complètement interverties dans ces conditions.

Le tableau VI resume les résultats observés.

TABLEAU VI

SUCRES RESTANTS DANS LES LIQUIDES FERMENTES

Levures.	Lactose g 0.	Glucose g 0.	Galactose g 0.
1	2,078	0	0,74
2	4,974	0,913	1,308
3	2,313	2,95	4,275
4	6,046	0,61	0
5	2,345	0,77	0,188
6	2,476	2,06	0,369
7	5,541	1,07	0
8	3,789	1,490	0,159
9	4,211	2,948	0,369
10	4,480	0,365	0
11	4,457	0,68	0
a	1,974	0,24	0,096
b	3,463	1,050	0
c	3,431	0,062	0,776

On peut déduire de ces chiffres que toutes les levures étudiées préfèrent le galactose au glucose, à l'exception du n° 2; cela prouve qu'elles sont bien adaptées à la fermentation du lactose.

On peut prévoir, en outre, qu'elles ne laissent diffuser à travers leur membrane cellulosique que des quantités

négligeables de lactase, puisqu'il y a partout du lactose non dédoublé.

Cependant, les proportions de lactose interverti au lactose varient dans des limites assez étendues; ce fait s'explique par un manque d'équilibre entre les actions respectives de la lactase et de la zymase; l'excès de lactose dédoublé se diffuse dans le liquide de culture; mais ceci n'est qu'une hypothèse; et il se peut que la lactase soit plus ou moins diffusible.

J'ai recherché cette diastase dans les liquides de culture, mais en limitant mes investigations à 3 levures seulement; il est évident en effet qu'il est inutile de rechercher la présence de lactase dans les cultures des levures 4, 7, 10, 11 et *b*, puisqu'elles ne renferment pas de galactose libre. Parmi les autres il y a également un choix à faire; là où le lactose atteint un taux élevé, on ne saurait non plus en trouver; les recherches se limitent ainsi aux levures 1, 2, *a* et *c* qui renferment peu de lactose relativement, et une proportion convenable de glucose et de galactose.

J'ai donc fait agir les liquides de culture sur des solutions de lactose à 10 ou 12 0/0 environ. On mélangeait 2 volumes de liquide de culture à 1 volume de solution de lactose à 25 ou 35 0 0, et on filtrait le mélange à travers une bougie Chamberland, de façon à obtenir un liquide stérile. On recueillait le liquide dans des fioles stériles, et on l'exposait pendant plusieurs jours à la température de 45°; les flacons étaient bouchés, afin d'éviter les pertes de liquide par évaporation. La recherche de la lactase a été faite dans les cultures âgées de 5 jours et de 11 jours, c'est-à-dire au moment où elles étaient en pleine activité et à la fin de la fermentation.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU VII

CULTURES EN PLEINE FERMENTATION

Lev.	Durée d'action.	Avant.		Après.		Différences.	
		Rotation.	Réduction.	Rotation.	Réduction.	Rotation.	Réduction.
2	47 heures	13°18' à 20°	6,2 c.c.	13°28' à 19°	6,05 c.c.	+ 40'	+ 0,15 c.c.
a)	46 —	7°42' à —	10,1	7°41' à 20°	10,15	+ 1'	+ 0,05
c)	41 —	7°32' à —	10,3	7°34' à 19°	10,3	+ 2'	+ 0,0

CULTURES A LA FIN DE LA FERMENTATION

2	42 heures	11°57' à 21°	6,8	12°14' à 19°	6,6	+ 16'	+ 0,20
a)	—	11°46' à —	6,8	11°58' à —	6,65	+ 12'	+ 0,15
c)	—	11°26' à —	6,85	11°50' à —	6,55	+ 24'	+ 0,30

Le pouvoir réducteur est exprimé par le nombre de c. c. des solutions de lactose diluées au 1/10, qui décolorent 10 c. c. de liqueur de Fehling dont le titre évalué en glucose est 5,47.

On voit que les levures *a* et *c* ne laissent pas diffuser la lactase pendant qu'elles sont encore jeunes, tandis que la levure 2 en abandonne une petite quantité dans le milieu ambiant ; quand la fermentation est achevée, on en trouve également dans les cultures de *a* et *c* ; ceci prouve que les cellules âgées en mettent en liberté probablement par voie d'autophagie ; la diastase recueillie de cette façon est cependant très peu abondante, et pour obtenir des quantités utilisables de lactase, il faudrait avec ces levures, comme toujours, avoir recours à un broyage. Je dois ajouter, cependant, qu'en réalité il y avait probablement un peu plus de diastase dans le liquide de culture, car le filtre en a retenu une certaine fraction.

Les liqueurs qui ont servi aux essais relatés au tableau VII ont été maintenues encore pendant 52 heures à la température de 45°, l'intervention n'a fait aucun progrès ; la diastase avait déjà été détruite par un séjour de 42 heures à 45°. Ce résultat montre que l'influence de l'acidité sur l'intervention du lactose est nulle, dans les conditions où je me suis placé.

Si on détermine, d'après les données du tableau VII, les quantités de lactose interverti, on obtient les chiffres suivants :

		Par la Réduction.	Par la Rotation.
		gr.	gr.
Levure 2	culture en pleine activité	0,7	0,5
2	à la fin de la fermentation	0,58	0,57
a)	—	1,170	1,14
c)	—	0,78	0,76

Il nous reste maintenant à voir quel crédit on peut accorder aux chiffres du tableau V, car le bouillon, indépendamment du sucre qu'on y a introduit, a une action sur la lumière polarisée ; le développement de la levure qui absorbe ou détruit, ou modifie les substances actives, produit une perturbation que l'on ne peut pas évaluer, et que l'on met, à tort, à l'actif des sucres ;

l'acide à haute température agit également sur elles ; cette dernière correction a été effectuée sur un bouillon privé de lactose ; mais elle ne saurait être qu'approximative ; il résulte de ces considérations que les chiffres en question ne traduisent pas d'une façon rigoureuse la composition du mélange de sucres qu'ils tendent à fixer.

S'il n'est pas possible de dissiper cette indétermination, on peut du moins fixer jusqu'à quelle limite ils sont acceptables. Si la liqueur soumise à l'intervention n'avait renfermé que du lactose, le rapport des pouvoirs rotatoires après et avant l'action de l'acide eût été 1,33, celui des pouvoirs réducteurs 1,44 ; mais il y avait en présence du lactose, des proportions variables de dextrose et de galactose ; ces deux derniers sucres n'ont subi aucune modification pendant l'inversion, les rapports visés se déduisent donc de l'expression suivante :

$$\frac{1,0526 \times \frac{x}{2} (\text{dextrose} + \text{galactose}) + y \text{ dextrose} + z \text{ galactose}}{x \text{ lactose} + (y \text{ dextrose} + z \text{ galactose})}$$

On voit immédiatement que la valeur de ce rapport ne peut pas être supérieure à 1,33 si l'on envisage les pouvoirs rotatoires, ou à 1,44 si on considère les pouvoirs réducteurs.

Les éléments de calcul qui ont servi à déterminer la composition du mélange de sucres restants, tableau VI, permettent également d'établir les valeurs correspondantes des rapports des pouvoirs rotatoires ou réducteurs après et avant l'inversion. Je les ai réunis dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU VIII

Levures.	Rapport des pouvoirs rotatoires.	Rapports des pouvoirs réducteurs.
1	1,22	1,27
2	1,20	1,17
3	1,40	1,32
4	1,40	1,38
5	1,24	1,25
6	1,29	1,18
7	1,37	1,32
8	1,37	1,27
9	1,21	1,20
10	1,24	1,37
11	1,35	1,36
a	1,27	1,29
b	1,27	1,30
c	1,24	1,26

Les rapports de la colonne 3 confirment naturellement les prévisions, puisqu'ils ne dépendent que de la nature et de la proportion des sucres présents; mais on voit que les chiffres trouvés pour les levures 3 et 4, comme exprimant le rapport des pouvoirs rotatoires, ne sont pas vraisemblables; et, en conséquence, les chiffres du tableau VI les concernant s'éloignent sensiblement de la réalité. Les autres valeurs trouvées rentrent à peu près dans les limites prévues et reflètent assez fidèlement la composition des mélanges de sucres restants.

*
* *

L'ensemble des renseignements qui précèdent montre que les levures examinées ne sauraient être identifiées entre elles; elles constituent autant de variétés distinctes.

On peut cependant recueillir encore quelques caractères différentiels relatifs à la façon dont elles se développent sur divers milieux, à l'aspect des cultures, à leur résistance aux acides ou aux alcalis et enfin à leur morphologie. Je résumerai brièvement tous ces caractères qui ne présentent pas une très grande fixité, et qui sont probablement destinés à se modifier un peu, étant donnés les changements profonds apportés dans leur existence par les conditions nouvelles qui leur sont imposées.

J'ai donné dans les tableaux II, III, IV, la durée des fermentations; on a vu qu'elle est variable pour les diverses espèces dans un même milieu, et pour une même espèce d'un milieu à un autre.

Les différences que je vais noter par la suite ont été relevées sur des cultures effectuées dans des tubes à essai de 18 m. m. de diamètre. Chaque tube recevait environ 15 c. c. d'un bouillon identique à celui qui a servi aux expériences résumées dans le tableau IV. La semence a été empruntée également au dépôt formé dans ces cultures et répartie à raison de 2 gouttes par tube.

J'ai groupé les renseignements obtenus dans le tableau suivant:

TABLEAU IX

Levures.	Aspect des cultures.	
	au 7 ^e jour.	Après un mois de conservation.
1	liquide louche	bourrelet.
2	clair	—
3	trouble	—
4	—	—
5	—	rien.
6	—	bourrelet.
7	louché	—
8	clair	—
9	—	voile fragile
10	—	voile.
11	trouble	voile.
a	—	bourrelet.
b	trouble formé de grumeaux	voile.
c	trouble	bourrelet.

La plupart des levures troublent le liquide ; ce trouble est plus ou moins persistant ; il dure jusqu'à la fin de la fermentation avec les levures *a* et *c* ; quelques-unes laissent le milieu parfaitement limpide pendant toute la durée de la fermentation, ce sont 2, 8 et 9. La levure *b* forme des grumeaux qui, vers le 5^e jour, sont entraînés à la surface par le dégagement du gaz et produisent un voile factice qui tombe plus tard ; la levure 11 produit le même voile. Si on conserve les levures pendant 1 mois, on remarque que quelques-unes donnent des voiles ; mais le plus grand nombre forment un simple bourrelet autour du ménisque dans la zone d'influence des forces capillaires.

Quant au développement, il n'offre rien de particulier ; la fermentation se déclare en moins de 24 heures à la température de 26°, cependant la levure *c* est notablement inférieure aux autres au point de vue du développement et de la rapidité avec laquelle apparaît la fermentation.

Avec les milieux solides on ne peut également faire que des observations de peu d'importance. Un seul met en relief quelques caractères assez tranchés ; c'est la gélose préparée avec du bouillon de haricot neutre additionné de 3 0 0 de saccharose. Un certain nombre de levures présentent en effet sur ce milieu, lorsqu'elles sontensemencées en surface, une couleur rouge lie de vin, plus ou moins prononcée ; ce sont : 2, 8, 9, 10 et *b* ; 2 et 10 se colorent très fortement ; 2 laisse diffuser la matière

colorante dans la gélose ; la levure 9 est modérément teintée ; 8 encore plus faiblement, et enfin, avec *b*, la couleur n'apparaît que dans les régions les plus saillantes et peut manquer complètement.

Sur gélose acide, la couleur rouge est beaucoup moins prononcée ; 8 et *b* ne se colorent pas sur ce milieu.

Si on examine l'action des levures sur les sucres fermentescibles les plus répandus, on constate qu'elles font fermenter le maltose en moût de bière, le saccharose, le sucre interverti, même en liquide Râulin, et par suite le dextrose et le lévulose offerts séparément ; mais la levure 3 a donné lieu à des observations assez curieuses sur lesquelles je reviendrai plus loin.

Considérées au point de vue de leur résistance aux acides et aux alcalis, elles se conduisent, à peu d'exceptions près, de la même façon. Comme substance alcaline, j'ai employé la soude à l'état de carbonate de sodium, et comme acide, j'ai accordé la préférence à l'acide lactique.

En milieu alcalin, si la levure se développe, elle finit toujours par faire fermenter le lactose ; mais, dans les liqueurs acides, on constate d'abord la disparition de la propriété de faire fermenter le lactose, la fermentation étant caractérisée par une effervescence visible lorsqu'on donne aux tubes quelques légères secousses ; il y a une limite d'acidité au delà de laquelle la levure se développe péniblement, mais sans faire fermenter ; elle mène une vie végétative fort difficile d'ailleurs ; puis l'arrêt du développement se constate à son tour, si l'on exagère encore les doses d'acide. Ce sont là des faits qui s'expliquent d'eux-mêmes, comme on le sait ; si la levure peut se développer, elle diminue l'alcalinité et atténue par conséquent l'influence nocive de la réaction, tandis qu'elle augmente au contraire le rôle empêchant de l'acidité.

Toutes les levures font fermenter le lactose dans le bouillon que j'ai utilisé en présence de 0,88 0/00 de soude, employée, je le répète à l'état de carbonate de sodium, tandis qu'à 1,1 0/00 aucune ne se développe. Quelques-unes parviennent à faire fermenter le sucre de lait dans le bouillon additionné de 2 0/0 d'acide lactique libre ; ce sont 5, 6, 11, *a* et *c* ; toutes les autres se développent également à l'exception de 2, mais ne produisent

pas de fermentation ; à la dose de 1 0/0, la levure 2 ne fait plus fermenter ; elle se développe encore à 1.5 0/0.

Quelques éléments de différenciation peuvent être tirés aussi de leur morphologie ; mais, dans l'ensemble, il est certain que les ressemblances l'emportent sur les différences. Ce n'est pas le microscope qui nous fournira les moyens de les distinguer.

Une seule, le n° 5, en 24 heures, a donné des spores sur blocs de plâtre, à la température de 26° ; malgré plusieurs tentatives faites en employant des levures de divers âges, mais toujours âgées de moins de 8 jours, je n'ai pas réussi à en faire produire à d'autres.

*
* *

La manière dont se comporte la levure 3 cultivée en présence de divers sucres mérite, comme je l'ai dit, d'être examinée ; elle ne fait fermenter ni le saccharose, ni le maltose, ni le sucre interverti et, par suite, le dextrose et le lévulose offerts séparément.

Quand je dis qu'elle ne fait pas fermenter ces sucres, cela signifie que, pendant toute la durée des cultures, on ne constate à aucun moment le moindre dégagement de gaz, même au moyen d'une agitation énergique ; mais si on recherche l'alcool dans les cultures, on en trouve toujours un peu.

Cette particularité est assez curieuse si l'on songe que, dans un milieu additionné de 10 0/0 de lactose, cette levure fait fermenter le dextrose dans des proportions assez élevées. Lorsque le lactose atteint 14 0/0, elle laisse une plus grande quantité de dextrose comme résidu, mais pas plus que la levure 9 qui fait fermenter tous les sucres étudiés indistinctement.

Si on la cultive dans un bouillon additionné de 5 0/0 de dextrose ou de lévulose, voici les quantités d'alcool que l'on obtient au bout de 14 jours.

TABLEAU X

	Acidité 0/00 en SO_4H^2	Alcool 0/0 en poids.
Glucose	0,539	0,60
Lévulose	0,437	0,57

Les cultures ont été effectuées dans des fioles de 125 c. c.

qui recevaient chacune 100 c. c. de bouillon ; la semence a été empruntée à une culture en présence de 10 0/0 de lactose.

Un peu plus de 1 0/0 de sucre a subi la fermentation alcoolique. Le développement, très lent, va cependant en progressant pendant toute la durée de l'expérience.

En réalité, il n'y a donc, *en apparence*, qu'une résistance plus forte à la fermentation, de la part de ces deux sucres ; la zymase ne fait pas complètement défaut ; mais il n'en est pas moins intéressant de voir que la levure 3, sortant d'une culture pourvue de lactose, ne soit pas plus active vis-à-vis du dextrose.

Pour pénétrer plus avant dans l'intimité de ce phénomène, j'ai effectué dans l'espace de 18 jours une série de 6 passages dans un milieu à peu près neutre, additionné de 5 0/0 de galactose. On voit donc que la semence transportée d'un tube à l'autre était toujours empruntée à une culture de 3 jours, au moment où la fermentation était déjà active. Le 6^e passage a servi à ensemer des milieux préparés avec un bouillon à peu près neutre, additionné de 5 0/0 de dextrose ou de lévulose, et de doses variables de galactose conformément aux indications suivantes :

TABLEAU XI

Milieu n° 1	Glucose 5 0/0	+	Galactose 0	témoin I.
2	—	—	+	0,5 0/0
3	—	—	+	1
4	—	—	+	2
5	Lévulose 5 0/0	+	—	0
6	—	—	+	0,5
7	—	—	+	1
8	—	—	+	2
				témoin II.

L'expérience a duré 14 jours, voici les résultats qu'elle a donnés.

TABLEAU XII

Milieux.	Alcool 0/0 en poids.
1 témoin I	0,43
2	0,66
3	0,83
4	1,056
5 témoin II	0,36
6	0,40
7	0,50
8	0,80

Seuls, les n^{os} 3, 4 et 8 ont montré pendant quelques jours

les symptômes d'une fermentation ; mais elle était peu active ; on n'a jamais observé de dégagement spontané de bulles de gaz au sein des liquides.

Les cultures ont été effectuées, comme celle du tableau X, dans des fioles de 125 c. c., chaque fiole recevant 100 c. c. de bouillon ; ce n'est donc pas une aération trop active des liquides de culture qui a pu conduire à ces résultats.

Le développement a été encore très lent dans les témoins, et dans les n^{os} 2 et 6 : mais il a progressé jusqu'à la fin ; et quand on a arrêté les cultures, on ne pouvait pas les distinguer les unes des autres par l'abondance du dépôt de levures qui s'était formé au fond des fioles : l'allure a été pourtant différente dans les n^{os} 3, 4, 7 et 8 : ici, en effet, la prolifération a été très active dès le début. Ces observations sont donc conformes à tout ce que l'on sait déjà sur la façon dont une levure se conduit vis-à-vis des sucres qu'elle fait fermenter ou qu'elle brûle peu à peu, sans les dédoubler d'une manière active en alcool et acide carbonique.

Le galactose, sucre qui fermente bien, favorise la multiplication de la levure : le dextrose et le lévulose, très résistants à la fermentation, sont incapables de produire une active prolifération cellulaire.

Les exemples de ce genre ne manquent pas dans le monde des levures, mais, jusqu'à présent, on avait toujours constaté que c'étaient le lactose et le galactose qui offraient cette résistance à la fermentation.

En réalité, le lactose doit surtout son inertie à l'absence de lactase chez les levures ordinaires, et cela le met hors de cause en ce qui concerne les faits que l'on envisage ici : ceux-ci intéressent le galactose seul, car on s'aperçoit aisément que c'est la double question de la pluralité des zymases ou de l'adaptation d'une zymase à la fermentation de plusieurs isomères qui est en jeu ici.

Les levures ordinaires peuvent être, pour la plupart, accoutumées à la fermentation du galactose ; lorsque cette accoutumance est acquise, elle se maintient de générations en générations, tant que celles-ci se succèdent dans un milieu pourvu de galactose ; on ne saurait évidemment, en présence de ces faits, choisir entre les deux interprétations possibles.

La levure 3 fait fermenter le dextrose issu du lactose : la

zymase qu'elle produit est donc accoutumée à deux sucres ; on ne peut tirer de là une autre conclusion, étant donnée l'idée que nous nous faisons de l'accoutumance, en admettant bien entendu que l'accoutumance porte sur l'extension de l'activité de la zymase, et non sur l'aptitude du protoplasme à fabriquer un nombre plus ou moins grand de diastases ; cette déduction se trouve d'ailleurs vérifiée pour toutes les levures de lactose étudiées ; mais elle est fausse pour la levure 3 ; et dès lors il faut bien interpréter les faits d'une autre façon, et en conclure qu'il y a une dextro-zymase et une galacto-zymase ; les levures de lactose produisent les deux zymases ; mais la levure 3 perd en grande partie sa faculté de produire la dextro-zymase lorsqu'elle est cultivée en présence du dextrose seul ; le galactose constitue pour elle, si l'on ne considère que les sucres, un aliment de premier ordre ; elle se développe activement en sa présence, ce qui veut dire qu'elle est surtout capable de produire de la galacto-zymase ; mais, en raison même de cette vigueur, elle peut fabriquer également beaucoup de dextro-zymase si on lui offre en même temps du dextrose, ce qui est la règle en présence du lactose ; elle ne conserve pas cette propriété dans un milieu additionné de dextrose ; il en résulte que son développement en souffre, et que la fermentation, très lente à se produire, reste toujours pénible.

Quand on la cultive pendant quelque temps en présence de galactose seul, et qu'on la replace ensuite dans un mélange des deux sucres en proportions variables, on voit, d'après les résultats du tableau XII, qu'elle a perdu en quelques jours la propriété de sécréter de la dextro-zymase en présence du galactose ; cette faculté n'est pourtant pas annihilée ; les cultures témoins montrent en effet que le dextrose fermente encore à peu près avec la même activité que lorsque la semence est empruntée à une culture en présence de lactose, tableau X ; mais il n'est pas douteux que dans les cultures 2, 3 et 4, la levure a commencé d'abord par consommer le galactose et le faire fermenter ensuite là où il était assez abondant ; les cellules formées aux dépens du galactose n'ont pas montré, par la suite, une activité appréciable vis-à-vis du dextrose, puisqu'elles n'ont donné qu'un poids d'alcool très légèrement supérieur à celui qui correspond au galactose présent.

J'ai toujours placé en regard des résultats obtenus avec le dextrose ceux qui ont été fournis par des expériences parallèles effectuées avec le lévulose ; ils sont, comme on le voit, de même ordre ; ils sont aussi particuliers à la levure 3, toutes les autres font fermenter le lévulose.

La notion de la multiplicité des zymases n'a rien qui doive nous surprendre, étant données nos connaissances actuelles sur la variation du nombre de diastases qu'une cellule peut produire ; elle rend compte, d'autre part, des distinctions si délicates que la cellule vivante établit entre les substances isomères ; elle nous permet également de comprendre pourquoi l'utilisation ou la fermentation de deux hexoses issus d'un disaccharide ou de deux isomères d'un mélange inactif ne se fait jamais d'une manière parfaitement parallèle.

CONCLUSIONS

Les levures de lactose sont très répandues dans la nature, au même titre que les levures de saccharose ou de maltose ; si on a pu les considérer comme des exceptions relativement rares, on doit admettre que leur monde est aussi peuplé en espèces que celui des premières, car un examen plus approfondi des fromages pourrait sans doute conduire à la découverte d'un grand nombre d'autres espèces.

Ces levures présentent cependant peu d'activité comme ferments alcooliques ; elles peuvent produire des quantités assez élevées d'alcool, mais à condition d'y mettre beaucoup de temps et de mettre en œuvre un poids de végétal relativement élevé.

Elles préfèrent généralement le galactose au dextrose ; la levure 3 examinée à ce point de vue présente des particularités assez curieuses qui ne peuvent s'expliquer que par la pluralité des zymases.

On peut se demander maintenant quel est le rôle des levures de lactose dans les fromages ; d'une manière générale, les fromages renferment peu de lactose ; et la faible quantité qui y persiste après l'égouttage est détruite de préférence par les ferments lactiques et les moisissures. En réalité il n'y en a guère que des traces qui subissent la fermentation alcoolique sous l'influence des levures ou des microbes producteurs d'alcool, et effectivement on en trouve dans tous les fromages ; mais comme

les levures communiquent aux milieux où elles se développent des qualités organoleptiques très marquées et souvent appréciées, il y a lieu de rechercher quel peut être leur rôle dans la production des bouquets. C'est une question qui a son intérêt pratique ; j'espère être bientôt en mesure de fournir là-dessus quelques renseignements.

INFLUENCE DE LA CONFIGURATION STÉRÉOCHIMIQUE DES GLUCOSIDES SUR L'ACTIVITÉ DES DIASTASES HYDROLYTIQUES

PAR HENRI POTTEVIN

Il n'y a pas bien longtemps encore, le rôle physiologique attribué aux diastases était des plus limités ; il se réduisait à présider aux transformations (changements d'état physique, ou dédoublements moléculaires) que doivent subir les aliments pour devenir aptes à pénétrer dans l'intérieur des cellules et à être utilisés par elles. Dans ces dernières années, ce cadre s'est considérablement élargi, et la plupart des phénomènes intracellulaires dont la production était considérée comme l'apanage du protoplasma vivant (combustions respiratoires, fermentations anaérobies, synthèse de molécules complexes), relèvent clairement aujourd'hui d'actions diastasiques ; si bien que la chimie biologique se trouve peu à peu ramenée à l'étude d'un certain nombre de ferments solubles, susceptibles d'être isolés des cellules et d'exercer en dehors d'elles leur activité spécifique.

Lorsqu'on veut aborder de front les transformations biochimiques des albuminoïdes, on est bientôt arrêté par l'insuffisance de nos connaissances sur la chimie de ces composés ; il n'en est plus tout à fait de même si on se tourne du côté des substances ternaires, celles-ci sont beaucoup mieux connues, et avec elles on peut, dans quelques cas, suivre d'assez près le mécanisme des actions diastasiques. L'étude de ces cas favorables est intéressante à double titre, d'abord à raison même de l'importance physiologique des phénomènes qu'elle éclaire, ensuite parce qu'elle fournit la seule base solide que l'on puisse donner aux inductions par lesquelles on essaie de pénétrer ce qui se passe dans les cas plus obscurs, et en particulier dans le domaine des corps azotés.

Les diastases hydrolytiques dont l'action s'exerce sur les dérivés des sucres constituent le groupe le mieux connu de ferments solubles ; à leur sujet, Fischer a le premier fixé l'atten-

tion sur les relations de structure moléculaire, qui semblent devoir exister entre la substance active et les corps qu'elle est capable d'hydrolyser. C'est à nos connaissances dans cet ordre d'idées que je me propose d'apporter une contribution.

I

On désigne sous le nom de glucosides des composés définis qui résultent de l'union des sucres avec des corps divers (acides, alcools, phénols, etc), et qui, sous l'influence des agents d'hydratation, fixent un certain nombre de molécules d'eau, et se dédoublent en leurs composants ; dans ce qui va suivre nous viserons seulement ceux qui dérivent de l'union des hexoses avec les alcools ou les phénols, mais parmi ceux-ci nous comprendrons les bihexoses et les trihexoses que l'on ne considère pas en général comme des glucosides, bien qu'ils le soient par toutes leurs propriétés et en particulier par la façon dont ils réagissent vis-à-vis des ferments solubles.

L'ensemble des propriétés des glucosides dont nous nous occupons conduit à les regarder comme des éthers-oxydes produits par la combinaison de deux molécules alkoylées, le sucre fonctionnant lui-même comme alcool, et à leur attribuer des formules analogues à la suivante :



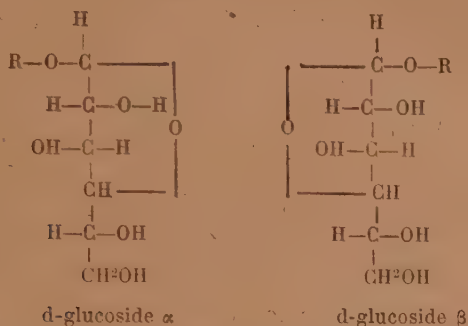
qui correspond à la combinaison d'un hexose



et de l'alcool méthylique $\text{CH}^3 - \text{OH}$ avec élimination de H^2O .

On dispose aujourd'hui de méthodes dues à Fischer, à Van Eckenstein, à Michaël, qui permettent de préparer synthétiquement les glucosides correspondant à l'union de la plupart des alcools et de quelques phénols avec un sucre quelconque. Les glucosides synthétiques les mieux connus se présentent chacun sous deux formes isomères, dont l'existence découle théoriquement, comme une conséquence nécessaire, du fait que, dans la molécule de sucre, le carbone auquel est fixé l'oxhydrile qui s'éthérifie est asymétrique. Les deux composés que fournit avec un même hexose, le d-glucose (glucose ordinaire) par exemple,

un même alcool R.OH répondent aux deux formules stéréoisomères,



Si donc on considère tous les glucosides dérivés du d-glucose, ils doivent pouvoir être rangés en deux séries d'homologues : celle des composés α et celle des composés β . En dehors des actions diastasiques que nous aurons à étudier plus loin, il n'existe aucun caractère physique ou chimique qui permette, d'une façon générale, un glucoside étant donné, de décider si sa place est dans l'une ou dans l'autre de ces deux séries ; pourtant, si on adoptait les vues de M. Simon ¹, on trouverait dans le pouvoir rotatoire même du composé une donnée susceptible de lever l'indécision dans un certain nombre de cas. Pour interpréter l'ensemble des réactions du d-glucose, on a été conduit à admettre qu'il peut exister sous 3 formes, stable chacune dans des conditions déterminées, et répondant l'une à la formule aldéhydique de Berthelot ², les deux autres aux deux stéréoisomères de la formule oxydique de Tollens citée plus haut. Lorsque Tanret eut découvert les trois formes tautomères du d-glucose, caractérisées, en particulier, par le pouvoir rotatoire instantané de leurs solutions aqueuses, on pensa tout de suite à rattacher ces formes aux formules précédentes : d'après Simon ce rattachement devrait être fait comme suit : la forme tautomère β qui, dissoute dans l'eau, prend immédiatement son pouvoir rotatoire limite de $+32^\circ 5$, et qui est la forme stable en solution aqueuse, correspond à la formule aldéhydique ; les deux formes α (glucose ordinaire cristallisé) et γ , dont les pouvoirs rotatoires instantanés sont respectivement $+106^\circ$ et $+22^\circ 5$, mais tendent à se rapprocher de $+32^\circ 5$ par deux birotations

1. SIMON, *Comptes rendus*, 25 février 1901.

2. $\text{CH}_2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{COH}$.

de sens inverse, correspondraient aux deux formules oxydiques. Les glucosides de la série α se rattacheraient à la forme tautomère α ; ceux de la série β , à la forme γ . Toutes les fois que le groupement alkoylé serait tel que sa substitution à l'oxyhydrile OH ne modifie pas de façon essentielle les relations intramoléculaires, d'où dépend le pouvoir rotatoire, les glucosides α posséderaient une rotation spécifique droite supérieure à celle du glucose, et ceux de la série β une rotation gauche, ou droite mais inférieure à celle du glucose $+ 52^{\circ},5$. Ces considérations, qui pourraient être étendues à tous les sucres, se vérifient bien pour les dérivés méthyliques des hexoses (les seuls pour lesquels on ait obtenu en fait les deux isomères à l'état isolé et pur), ainsi qu'on peut le voir par le tableau ci-dessous.

	α D (en solution aqueuse).
D-glucose.	$+ 52^{\circ},5$
Méthyl-d-glucoside α .	$+ 135^{\circ},5$
Méthyl-d-glucoside β .	$- 31^{\circ},85$
D-galactose.	$+ 83^{\circ},2$
Méthyl-d-galactoside α .	$+ 178^{\circ},8$
Méthyl-d-galactoside β .	$+ 2^{\circ},2$

Nous examinerons par la suite dans quelle mesure les indications tirées de l'hypothèse de Simon cadrent avec celles que fournit l'étude des actions diastasiques.

Les glucosides sont extrêmement répandus dans les tissus vivants : à côté d'eux on trouve toujours les diastases qui doivent présider à leurs mutations et qui, capables selon toute vraisemblance d'en effectuer la synthèse, ont la propriété de les dédoubler par une action inverse de celle qui leur a donné naissance, fixation de H^2O et mise en liberté des composants. Chaque diastase est, en général, capable d'exercer son action hydrolytique sur un certain nombre de glucosides.

Considérons la maltase (ou plus exactement la solution de diastases que l'on obtient en faisant macérer dans l'eau de la levure de bière préalablement desséchée et tuée) et l'émulsine (solution fournie par les amandes amères). La maltase hydrolyse le maltose et le méthyl-d-glucoside α , elle n'attaque ni le méthyl-d-glucoside β ni les glucosides naturels (amygdaline¹, arbutine, salicine, coniférine, etc.); l'émulsine est

1. La maltase produit sur l'amygdaline une hydrolyse partielle : il ne se forme ni aldéhyde benzoïque ni acide cyanhydrique, mais des deux molécules de glucose.

douée de propriétés inverses. elle hydrolyse les glucosides naturels déjà cités, et le méthyl-d-glucoside β ; mais elle est sans action sur le maltose et le méthyl-d-glucoside α . Fischer, qui a découvert et généralisé ces faits, a admis pour les expliquer que la substance diastasique active possède une constitution stéréochimique en rapport avec celle des corps qu'elle est capable d'attaquer : la diastase et le glucoside seraient l'un à l'autre « ce que la clef est à la serrure ».

Les données qui définissent la stéréochimie d'un glucoside sont, d'après ce que nous avons dit plus haut : 1° la nature du sucre générateur ; 2° la position α ou β de la molécule alkylée. Pour justifier l'hypothèse de Fischer, il faudrait établir par l'expérience que *chaque diastase limite son action aux dérivés d'un même sucre, et parmi ceux-ci aux homologues d'une même série α ou β* . Comme nous ne savons ni déterminer complètement un glucoside, ni séparer les uns des autres et isoler à l'état pur les divers ferments solubles, nous devons renoncer à la méthode simple qui consisterait à faire agir des diastases pures sur des glucosides bien définis, et force nous est d'aborder le problème par des voies détournées.

La maltase est caractérisée par la propriété de dédoubler le maltose en deux molécules de glucose : pour pouvoir dire qu'elle est inactive vis-à-vis des dérivés du d-fructose et du d-galactose par exemple, il faut et il suffit que nous trouvions un ou plusieurs mélanges diastasiques capables d'hydrolyser le maltose, contenant par conséquent de la maltase, et incapables d'agir sur aucun des dérivés des deux autres sucres. Prenons d'autre part la maltase et l'émulsine, chacune d'elles hydrolyse l'un des deux méthyl-d-glucosides, elles doivent représenter l'une la diastase des composés α , l'autre la diastase des composés β dérivés du d-glucose ; et il doit être possible dès lors de constituer avec les glucosides du d-glucose deux séries distinctes, sans termes communs, telles que tous les glucosides d'une série soient dédoublés par l'émulsine et non par la maltase, tandis que

qu'on contient la molécule d'amygdaliné, une se trouve détachée et il reste un glucoside nouveau : le nitrile amygdalique, entièrement dédoublable par l'émulsine.

1. Ce n'est pas tout à fait ainsi que l'entendait Fischer puisqu'il admettait, par exemple, que la maltase dédouble le maltose et le méthyl-d-fructoside, « à cause de la ressemblance de constitution entre le d-glucose et le d-fructose ». Mais il semble difficile de concevoir que la constitution du sucre lui-même ait moins d'importance au regard de la diastase que la position de la molécule étherifiée.

pour ceux de l'autre série ce soit l'inverse. On devra raisonner de même pour chaque diastase et pour chaque sucre. La possibilité de vérifier expérimentalement les conséquences des idées de Fischer se trouve donc subordonnée à la connaissance de mélanges diastasiques doués de propriétés déterminées; pour l'obtention de tels mélanges on n'a disposé jusqu'ici d'aucune méthode générale et on a dû se borner à tirer parti de ceux que le hasard a fait rencontrer. Il est naturel que les vérifications n'aient pu s'étendre au delà des diastases les plus communes (invertine, maltase, émulsine, lactase) et que, même dans ce domaine limité, elles n'aient pu se faire que par tâtonnements ¹.

Les premières recherches de Fischer avaient abouti à des données un peu confuses ². Ce savant admettait, en particulier, que l'invertine hydrolyse à la fois le saccharose, le maltose et les méthyl-d-glucosides de la série α : plus tard il a trouvé que *S. Marxianus*, qui fait fermenter le saccharose et non le maltose, fournit une solution de ferments hydrolysant le saccharose, mais sans action sur le maltose et sur le méthyl-d-glucoside α ; tandis que pour le *S. Octosporus* c'est le contraire: cette levure fait fermenter le maltose et non le saccharose, elle fournit une solution de ferments hydrolysant le maltose et le méthyl-d-glucoside α , sans action sur le sucre de canne: il en a conclu que l'hydrolyse du saccharose et celle du maltose étaient l'œuvre de deux diastases différents, l'invertine et la maltase, cette dernière seule étant capable d'agir sur le méthyl-d-glucoside α ³. En acceptant cette donnée, que nous aurons d'ailleurs l'occasion

1. Il existe beaucoup de glucosides dérivés du d-glucose, le saccharose en tête, la phlorididine, le gallotannin, etc., qui résistent à l'action de l'une et de l'autre des deux diastases complémentaires, émulsine et maltase. Il n'y a là rien qui soit en contradiction avec les considérations que nous avons développées; celles-ci, en effet, n'impliquent nullement que la constitution stéréochimique doive intervenir seule, comme condition unique, pour déterminer la façon d'être réciproque des glucosides et des diastases. D'une part la nature de la molécule alkylée doit intervenir pour modifier la résistance du composé vis-à-vis d'une action hydrolytique quelconque, comme elle intervient pour modifier les chaleurs de formation et de déboulement; d'autre part rien ne nous dit que tous les dérivés α du d-glucose soient bâtis rigoureusement sur un type unique, et qu'il n'existe pas entre eux des cas d'isomérie secondaire d'ordre non stéréochimique. Pour toutes ces raisons, on comprend qu'il puisse et qu'il doive exister plusieurs espèces, dans chacun des deux genres de diastases qui correspondent aux deux séries d'isomères α et β .

2. V. DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. II, p. 422 et suiv.

3. FISCHER ET LINDNER, *Berichte*, XXVIII, p. 984.

de confirmer par la suite, on peut classer de la façon suivante les uns par rapport aux autres les glucosides et les diastases étudiés.

L'*invertine* dédouble le saccharose, le raffinose (en 1 molécule de lévulose et 1 molécule de mélibiose ¹), le gentianose (en 1 molécule de lévulose et 1 molécule de gentianobiose ²).

La *maltase* dédouble le maltose, le méthyl-d-glucoside α ³, l'éthyl-d-glucoside α ⁴, le benzyl-glucoside et le glycérine-glucoside (ces deux dérivés n'ont été obtenus qu'à l'état de sirop incristallisable contenant un mélange des deux isomères α et β dont un seul est attaqué ⁵), l'amygdaline ⁶, le tréhalose ⁷, le méthyl-d-fructoside ⁸.

L'*émulsine* dédouble l'amygdaline, la coniférine ⁹ et ses dérivés, la picéine, la salicine, l'hélicine, l'esculine, l'arbutine, le lactose et le méthyl-d-galactoside β ¹⁰, le benzyl-glucoside et le glycérine-glucoside (l'isomère qui n'est pas attaqué par la maltase ¹¹) le phénol-glucoside ¹², le β carvacrol-glucoside ¹³.

La *lactase* dédouble le lactose.

La classification précédente est, en gros, d'accord avec la loi que nous avons énoncée, mais il y a contradiction sur quelques points.

Pour l'*invertine* il n'y a pas de difficulté, car les sucres hydrolysés peuvent tous les trois être considérés comme des dérivés du d-fructose (lévulose), le groupement alkoylé étant constitué respectivement par les molécules de glucose, de mélibiose, de gentianobiose, et rien ne s'oppose à ce qu'ils soient rangés dans la même série de d-fructosides.

Pour la *maltase*, nous trouvons à côté du maltose et du tré-

1. SCHEIBLER ET MITTELMEIER, *Berichte*, XXII, p. 3188. — BAU, *Wochensch. Brauerei*, XV, p. 389. — FISCHER, *Berichte*, XXVIII, p. 3034.

2. BOURQUELOT ET HERISSEY, *Journ. de Ph. et de Chim.*, 1902, p. 417.

3. FISCHER ET LINDNER, *L. c.*

4. FISCHER, *B.*, XXVII, p. 2985.

5. FISCHER, *B.*, XXVII, p. 2985.

6. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1508. — V. p. 5, note.

7. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429. — BOURQUELOT, *C. R.*, CXVI, p. 826.

8. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429.

9. Pour les glucosides naturels, voir. VAN RIJN, *Die Glycoside*, Berlin, gebrüder Bornträger, 1900.

10. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429.

11. FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 2400.

12. FISCHER, *B.*, XXVII, p. 2985.

13. HUGH RYAN, *Proced. Chem. Soc.*, XV, p. 196.

halose, qui se dédoublent tous les deux en deux molécules de d-glucose, un certain nombre de glucosides dérivant du même d-glucose, mais aussi un dérivé du d-fructose, le méthyl-d-fructoside.

Pour l'émulsine, tous les corps dédoublés dérivent du d-glucose, sauf le méthyl-d-galactoside β et le lactose. Le sucre de lait doit en effet être considéré comme un galactoside, car oxydé par le brome à froid, il donne un acide monobasique, l'acide lacto-bionique, que l'ébullition avec les acides étendus dédouble en galactose et acide gluconique : le groupement réducteur de la molécule de lactose appartient donc au glucose, qui intervient dans la formation du galactoside par un des groupes alcool de sa chaîne.

Nous allons examiner successivement les points sur lesquels portent les discordances entre ces données et notre loi ; mais auparavant et pour n'avoir plus à y revenir, je vais fournir les indications nécessaires sur les glucosides synthétiques dont j'aurai à me servir.

Le méthyl-d-glucoside α et les deux méthyl-d-galactosides ont été préparés par les méthodes de Fischer ¹ et de Van Eckenstein ² ; le méthyl-d-glucoside a été purifié par des cristallisations successives dans l'alcool ; les deux méthyl-d-galactosides ont été séparés par cristallisation fractionnée dans l'éther acétique. Les corps bien cristallisés ainsi obtenus possédaient les constantes ci-dessous.

	Point de fusion.	Pouv. Rot. α D.
Méthyl-d-glucoside α .	165°	+ 158°,2
Méthyl-d-galactoside α .	- 110°	+ 177°,8
Méthyl-d-galactoside β .	176°	neutre.

Le méthyl-d-fructoside a été préparé en suivant les indications de Fischer ³. On obtient ainsi un sirop incristallisable qui contient vraisemblablement un mélange des deux isomères α et β , il contient aussi toujours une petite quantité de lévulose non combiné. Pour éliminer le petit excès de lévulose qui eût été gênant dans certaines expériences, j'ai traité le sirop, convenablement étendu et stérilisé par filtration, par le *Saccharomyces*

1. FISCHER, B., XXVIII, p. 1145.

2. VAN ECKENSTEIN, *Recueil des Tr. Ch. des Pays-Bas*, XIII, p. 183.

3. FISCHER, B., XXVIII, p. 1145.

apiculatus. La levure cultivée sur de l'eau de touraillons glucosée solidifiée par la gélose avait été raelée, lavée à l'eau stérile, puis ajoutée aseptiquement au sirop. Après un mois de séjour à l'étuve, le liquide ne donnait plus de réduction appréciable à la liqueur de Fehling.

Le glycérine-glucoside a été préparé suivant les indications de Fischer et Bensch¹. On obtient un sirop incristallisable re-fermant un mélange des deux isomères α et β : ramené à la concentration de 10 0/0 (en glucoside supposé anhydre), il contenait encore 0,29 0/0 de glucose qui n'a pas été éliminé. Si on soumet le sirop à l'action séparée de la maltase et de l'émulsine, on constate que, sous l'influence des diastases, sa rotation spécifique diminue dans le premier cas, augmente dans le second, d'où il suit que les glucosides dédoublés possèdent des pouvoirs rotatoires qui sont, par rapport à celui du glucose, supérieur dans un cas, inférieur dans l'autre.

Un sirop de glycérine-glucoside, mélangé à son volume d'une solution diastasique filtrée, obtenue en faisant macérer, dans l'eau saturée de toluène, de la levure de bière préalablement desséchée à basse température, abandonné à l'étuve à 35°, a donné :

	Rot. α D.	Glucose en 100 c. c.
Au début.	+ 7°,8	0,14
Après 1 jour.	+ 6°,0	1,00
Après 3 jours.	+ 5°,2	1,19

Etant donnés la diminution subie par la rotation spécifique et l'augmentation de la teneur en glucose, on peut calculer le pouvoir rotatoire du glucoside qui a subi l'hydrolyse; ce pouvoir serait, pour le corps $C^9H^{18}O^8$, de 160°

Dans une autre expérience, 0,5 d'émulsine sèche ont été délayés dans 20 c. c. d'eau et ajoutés à 50 c. c. du sirop de glycérine-glucoside; le mélange a été saturé de toluène et placé à l'étuve à 35°, il a donné

	Rot. α D.	Glucose en 100 c. c.
Au début.	10°,6	0,20
Après 1 jour.	10°,2	0,46
Après 3 jours.	10°,0	0,59

L'augmentation du pouvoir rotatoire est faible mais certaine, je l'ai observée d'une façon constante en renouvelant à maintes reprises l'essai; cet augmentation est trop voisine des erreurs

1. FISCHER ET BENSCH, *B.*, XXVII, p. 2478.

inévitables de lecture pour qu'on puisse tirer de l'expérience, pour le pouvoir rotatoire du glucoside dédoublé, un nombre présentant quelques garanties d'exactitude, mais on est bien assuré que ce pouvoir rotatoire est inférieur à celui du glucose.

II

Fischer attribue à la maltase la propriété d'hydrolyser le méthyl-d-fructoside pour les raisons suivantes : la macération de levure fraîche contient de l'invertine, car elle hydrolyse le saccharose, mais elle n'attaque ni le maltose, ni les autres d-glucosides, ni le méthyl-d-fructoside; la macération obtenue en employant la levure préalablement broyée ou desséchée à basse température dédouble au contraire, outre le saccharose, le maltose, les méthyl-d-glucosides de la série α et le méthyl-d-fructoside. En précipitant cette macération par l'alcool, reprenant le précipité par l'eau, précipitant à nouveau, et ainsi de suite plusieurs fois, on obtient une diastase qui n'agit plus que sur le saccharose.

Si ces données impliquent que l'hydrolyse du méthyl-d-fructoside n'est pas le fait de l'invertine, elles n'excluent pas l'hypothèse d'après laquelle cette hydrolyse serait due à une diastase différente de la maltase, mais se comportant comme elle dans les conditions des expériences sus-visées; il faut remarquer en effet que les propriétés de diffuser péniblement au travers des parois cellulaires intactes et de perdre rapidement toute activité par des précipitations successives à l'alcool sont communes à la plupart des ferments solubles.

Pour trancher la question, nous allons rechercher s'il existe des solutions de diastases capables d'hydrolyser le maltose sans attaquer le méthyl-d-fructoside. J'ai obtenu des mélanges diastasiques jouissant de ces propriétés avec le *schizosaccharomyces octosporus*, le *mucor alternans*, le *mucor mucedo*, etc.

J'ai isolé de sur des figues de Smyrne, en suivant les indications de Beijerinck ¹, un organisme présentant tous les caractères

1. V. DUCLAUX. *Microbiologie*, t. III, p. 635.

du *schizo-saccharomyces octosporus*. La culture qui a servi aux expériences contenait un mélange de cellules asporogènes rondes ou légèrement elliptiques, d'un diamètre de 6 à 10 μ , et de cellules sporulées, grosses, atteignant 18 et 20 μ , et présentant à leur intérieur les 8 ascospores caractéristiques; cette culture donnait sur mout de bière gélosé une couche blanche, légèrement teintée de brun.

Ensemencé dans du mout de bière, mon *schizo-saccharomyces* se développe en déterminant rapidement une fermentation assez active; il se comporte de même dans l'eau de touraillons additionnée de maltose, de glucose ou de lévulose, mais il ne détermine aucune fermentation dans l'eau de touraillons additionnée de saccharose.

Pour expérimenter avec les glucosides de synthèse, le *schizo-saccharomyces* était cultivé sur mout de bière gélatiné dans des boîtes de verre, la culture raclée était mise en suspension dans l'eau stérile, lavée à plusieurs reprises par décantation, puis introduite avec pureté dans des tubes à essai stériles, où on ajoutait ensuite les solutions des glucosides à 10 0/0, stérilisées par filtration : avec le maltose, le méthyl-d-glucoside α , le glycérine-glucoside; on a observé des fermentations actives. Dans les deux derniers cas, le dégagement d'acide carbonique était moins vif que dans l'autre, mais il se prolongeait plus longtemps : au bout de 8 jours 70 0/0 du maltose avait disparu, et la fermentation était extrêmement ralentie; il restait encore 60 0/0 de méthyl-d-glucoside et 80 0/0 de glycérine-glucoside, la fermentation se poursuivait dans ces deux cas aussi active qu'au début.

Avec le saccharose et le méthyl-d-fructoside, il n'y a pas eu de fermentation; après 8 jours de séjour à l'étuve le pouvoir rotatoire du liquide n'avait pas changé, preuve que les glucosides n'avaient subi aucune attaque; à ce moment l'addition d'un peu de levure de bière dans les tubes en expérience déterminait au bout de quelques heures une fermentation énergique.

Le *mucor mucedo* et le *mucor alternans* sont des organismes bien connus; il n'y a pas lieu d'insister sur leurs caractères. Pour l'expérience, ils étaient cultivés sur mout de bière, dans des fioles à fond plat dont le goulot était fermé par un bouchon

traversé par deux tubes; l'un de ces tubes s'arrêtait au haut de la fiole tandis que l'autre descendait jusqu'au fond; grâce à ce dispositif, on pouvait facilement renouveler aseptiquement le liquide au-dessous de la culture.

Les champignons formaient à la surface du liquide un mycélium spumeux et déterminaient un dégagement d'acide carbonique actif. Quand le développement de la culture était suffisant, on soustrait le liquide, on le remplaçait par de l'eau stérile, on lavait ainsi à plusieurs reprises le mycélium, puis on introduisait une solution à 10 0/0 du glucoside à étudier, préalablement stérilisée par filtration: en agitant la fiole on immergeait autant que possible le champignon, et on abandonnait à l'étuve à 35° après avoir fermé à la lampe le tube plongeant et relié l'autre à un tube recourbé s'ouvrant sous le mercure.

Avec le maltose, le méthyl-d-glucoside α , le glycérine-glucoside, j'ai obtenu des dégagements rapides d'acide carbonique: avec le saccharose et le méthyl-d-fructoside, il ne s'est pas produit de dégagement appréciable: comme dans le cas du *schizosaccharomyces octosporus* au bout de 8 jours, le pouvoir rotatoire des solutions n'avait pas varié.

Le fait que le méthyl-d-fructoside ne fermente avec aucun des organismes mis en œuvre implique bien qu'il n'est pas dédoublé par leurs diastases, pourtant très actives vis-à-vis du maltose et des d-glucosides; j'ai tenu cependant à vérifier directement le fait. Pour obtenir les solutions de diastases, les organismes (culture raclée de sur gélose au moût de bière pour le *S. octosporus*, *mycelium* prélevé sur moût de bière après lavage à l'eau pour les mucors) étaient broyés à la molette avec du verrepilé jusqu'à ce que l'examen microscopique de l'espèce de pâte homogène ainsi obtenue montre qu'une bonne partie des cellules avait été dilacérée, puis mis à macérer 24 heures dans l'eau chloroformée.

Le liquide de macération était privé de chloroforme à 45° sous pression réduite et stérilisé par filtration. Chaque essai se faisait en mélangeant dans un tube stérile 5 c. c. de la solution diastasifère et 5 c. c. de la solution à 10 0/0 des glucosides filtrés; les tubes étaient ensuite fermés à la lampe, vides d'air, et abandonnés à l'étuve à 35°. En procédant ainsi on évite les causes d'erreur qui viennent fausser les résultats lorsqu'on opère en milieu

non stérile additionné d'antiseptiques; ceux-ci ne sont jamais absolument indifférents vis-à-vis des diastases, ils exercent toujours sur elles une influence dont il est d'autant plus difficile de tenir compte qu'elle varie d'une diastase à l'autre et, avec une même diastase, selon les conditions de l'expérience.

La précaution de sceller les tubes à la lampe, vides d'air, évite l'altération des substances actives qui se produit en général assez vite à 35° au contact de l'oxygène; on peut dès lors prolonger le contact des ferments et du glucoside autant qu'on veut, en sorte qu'une quantité même extrêmement faible de ferment arrivera toujours à produire une action appréciable.

J'ai opéré suivant la même technique dans tous les essais que j'aurai à rapporter plus loin : l'indication est dès maintenant donnée une fois pour toutes.

EXP. I. Les essais faits comparativement avec le saccharomyces octosporus, les deux mucors et une levure de Froberg ont donné les résultats suivants.

Glucoside mis en œuvre.	Durée de l'action.	Sucre réducteur total (en glucose) produit par les diastases.			
		de S. Octosp.	de M. Mucedo.	de M. alt.	de Lev. Froh
Maltose.	8 jours	0,18	0,16	0,22	0,20
Saccharose.	8 —	0,30	0,25	0,38	0,42
Méthyl-d-gluc. α.	8 —	0,09	0,07	0,15	0,15
Méthyl-d-fruct.	1 mois	0	0	0	0,12

Il est donc bien établi qu'on ne peut attribuer à une seule et même diastase l'hydrolyse du maltose et celle du méthyl-d-fructoside. N'étaient les observations de Fischer rapportées plus haut, en présence du fait que toutes les levures capables d'attaquer le saccharose attaquent aussi le méthyl-d-fructoside, on inclinerait à ranger ce dernier parmi les glucosides qui relèvent de l'invertine. Peut-être les observations de Fischer pourraient-elles s'expliquer par la résistance du fructoside à l'action des ferments, résistance certainement supérieure à celle du sucre de canne. Mais à raison de l'incertitude qui règne sur la composition des mélanges que nous appelons d'un même nom, méthyl-d-fructoside, il n'y a pas lieu de pousser plus loin sa comparaison avec le saccharose.

Nous laisserons donc de côté la question de savoir si les deux

glucosides sont hydrolysés par une seule diastase ou par deux diastases différentes; le seul point qu'il nous importe d'avoir bien fixé, c'est que le méthyl-d-fructoside n'est pas hydrolysé par la maltase.

Il m'a paru intéressant de rechercher comment se comportent vis-à-vis des glucosides synthétiques la maltase du sang et celle de l'urine. Fischer avait annoncé des expériences établissant que la maltase du sang de bœuf et celle du sang de cheval hydrolysant le maltose, mais sont sans action sur le méthyl-d-glucoside ¹; il n'est pas à ma connaissance que ces expériences aient été publiées depuis.

Pour les expériences sur la maltase du sang, le sang était recueilli aseptiquement, le sérum séparé de même était mélangé dans des tubes stériles à la moitié de son volume d'une solution de glucoside filtrée. On appréciait la marche de l'action diastasique par la variation du pouvoir rotatoire du mélange et par un dosage du sucre réducteur formé avant ce dernier dosage, le mélange était privé de ses matières albuminoïdes par ébullition avec l'acide acétique au 1/1000, puis avec l'acétate de fer; ce traitement est sans action sur les glucosides méthylique et glycérique, aussi bien d'ailleurs que sur le maltose. L'action diastasique s'accomplissait à la température de 35°.

Exp. II. — Sang de cheval nourriture mixte, foin et avoine, pris dans la jugulaire, sur l'animal à jeun. Chaque tube recevait 10 c. c. de sérum et 5 c. c. de la solution des glucosides.

Glucoside (5 c. c. de solution)	Temps de l'incubation	Glucose (grammes)
Maltose.	8 jours	0.47
Méthyl-d-glucoside.	8 —	0.29
Glycérin-glucoside.	8 —	0.12

Exp. III. — Sang de lapin. A. lapin nourri d'herbe; B. lapin nourri de son et d'avoine. 5 c. c. de sérum et 2.5 c. c. de solution de glucoside à 25 0/0.

¹ FISCHER, *B.*, XXVIII, p. 1429.

Glucosides mis en œuvre.	Durée de contact.	Glucose produit.	
		A	B
Maltose.	8 jours	0,49	0,45
Méthyl-d-gluc. α .	8 —	0,22	0,08
Glycérine-gluc.	8 —	0,46	0,02

L'urine était mélangée à son volume (10 c. c. de la solution des glucosides à 10 0/0), le mélange saturé de chloroforme était abandonné à 35° dans des tubes scellés.

Exp. IV. — Urine du matin (homme, régime mixte).

Glucosides mis en œuvre.	Durée de contact.	Glucose produit.	
		A	B
Maltose.	2 jours		0,20
Méthyl-d-gluc. α .	2 —		0,12
Glycérine-gluc.	2 —		0,07

La maltase du sang et celle de l'urine sont donc capables d'hydrolyser non seulement le maltose, mais encore le méthyl-glucoside α ; elles ne se distinguent pas de la maltase des ferments¹.

Nous allons envisager maintenant l'anomalie relevée parmi les glucosides hydrolysés par l'émulsine, et nous procéderons comme dans le cas précédent, nous chercherons s'il existe des mélanges diastasifères capables d'hydrolyser les glucosides de la série β , mais sans action sur le lactose et sur le méthyl-d-galactoside β . Le sucre de lait constitue un édifice moléculaire particulièrement résistant vis-à-vis des actions biochimiques en général; la presque totalité des levures est hors d'état d'agir sur lui, et même, pour celles qui peuvent le faire fermenter, il constitue un aliment bien inférieur au sucre de canne; enfin, beaucoup de mucédinées, pourtant très polyphages, ne peuvent se développer si on les ensemece directement sur un milieu de culture contenant du lactose comme unique aliment hydrocarboné. Il était indiqué de demander à ces moisissures des mélanges diastasifères incapables de dédoubler le lactose, tout en étant capables d'agir sur l'ensemble des d-glucosides β .

L'*Aspergillus niger* cultivé sur liquide Raulin normal (où l'aliment hydrocarboné est le sucre de canne) fournit par macération dans l'eau chloroformée un liquide riche en diastases

1. V. BOUQUELOT et HÉRAISSEY, *Bulletin Soc. mycol.*, 1894.

diverses, cette solution de ferments hydrolise le saccharose, le maltose et les d-glucosides de la série α , les d-glucosides de la série β , mais il est sans action sur le sucre de lait et sur les deux méthyl-d-galactosides.

EXP. V. — Les solutions diastasiques, privées de chloroforme et filtrées, et les glucosides ont été mis en présence dans des tubes scellés, comme il a été dit plus haut, puis abandonnés à la température de 35°. Les résultats ont été les suivants :

Corps mis en expérience.	Teneur 0/0 du mélange en glucoside dissous.	Durée de l'action.	Glucoside dédoublé 0,0
Saccharose.	10	3 jours	83
Maltose.	10	—	67
Méthyl-d-glucoside α .	5	—	39
Amygdaline.	4	—	64
Arbutine.	4	—	52
Lactose.	10	1 mois	0
Méthyl-d-galactoside α .	5	—	0
Méthyl-d-galactoside β .	5	—	0

Il apparaît donc qu'on ne peut attribuer à une seule et même diastase le dédoublement des d-glucosides de la série β et celui du lactose et du méthyl-d-galactose β ; l'hydrolyse de ces deux derniers composés par l'émulsine, qui est réelle, est due certainement à la présence d'une lactase dans l'extrait d'amandes.

Les spores d'*Aspergillus niger*, semées sur un liquide Raoult où le saccharose est remplacé par du lactose, donnent des filaments mycéliens qui n'acquiescent pas un développement supérieur à celui qu'ils peuvent acquiescent dans le même liquide privé de sucre; mais si, sous une culture florissante d'*Aspergillus*, on remplace le liquide nourricier par une solution de lactose additionnée de sels, la plante continue à se développer et consomme le sucre de lait. Si on prélève alors le mycélium, il donne encore, par simple macération dans l'eau chloroformée, une solution de ferments inactive sur le lactose et sur les méthyl-d-galactosides; mais si on broie la plante avec du verre pilé, avant de la mettre à macérer, on obtient une solution qui dédouble le lactose et le méthyl-d-galactoside β , mais respecte le méthyl-d-galactoside α .

EXP. VI. — Macération de mycélium broyé: 5 c. c. de macération et 5 c. c. de solution des glucosides à 10 0 0.

Corps mis en expérience.	Durée du contact.	Glucoside dédoublé 0/0.
Lactose.	2 jours	30
—	4 mois	60
Méthyl-d-galact. α .	—	0
Méthyl-d-galact. β .	—	48

Si, au lieu d'un liquide Raulin lactosé, on introduit sous l'*Aspergillus* une solution de méthyl-d-galactose β , celui-ci est consommé, et la plante broyée fournit une solution de diastases dont les propriétés sont identiques à celles du mélange obtenu avec le lactose. Il n'en est plus de même si on remplace le galactoside β par son homologue α : celui-ci est bien encore décomposé et brûlé par la moisissure, mais la lactase qu'il fournit diffère de la première, elle hydrolyse le méthyl-d-galactoside α , mais reste inactive vis-à-vis du lactose et du méthyl-d-galactoside β .

Exp. VII. — Macération d'*Aspergillus*, sous lequel on a introduit une solution de méthyl-d-galactoside β : 5 c. c. de solution diastasifère et 5 c. c. de solution des galactosides à 10 0/0.

Corps mis en expérience.	Durée de l'action.	Galactoside dédoublé 0/0.
Lactose.	4 mois	40
Méthyl-d-gal. α .	—	0
Méthyl-d-gal. β .	—	28

Exp. VIII. — Macération d'*Aspergillus*, sous lequel on a introduit une solution de méthyl-d-galactoside α , 5 c. c. de solution diastatique et 5 c. c. de solution des galactosides à 10 0/0.

Corps mis en expérience.	Durée de l'action.	Galactoside dédoublé 0/0.
Lactose.	4 mois	0
Méthyl-d-galact. α .	—	35
Méthyl-d-galact. β .	—	0

Comme le méthyl-d-galactoside β ne peut être isolé que péniblement, et en quantités relativement faibles, des liqueurs mères de cristallisation du dérivé α , et constitue par conséquent un produit précieux, il est commode, si on veut constater la production par l'*Aspergillus* des deux d-galactases séparément, de procéder comme il suit : en introduisant sous le mycélium un liquide Raulin à 5 0/0 de lactose, on détermine l'apparition de la diastase β ; en remplaçant le sucre de lait par le mélange

brut des deux méthyl-galactosides, on détermine l'apparition des deux diastases à la fois.

Il me paraît intéressant d'insister sur ce fait que, étant donné une plante ne sécrétant pas normalement de lactase, comme l'*Aspergillus niger*, on peut, en variant la nature de l'aliment qu'on lui offre, obtenir séparément chacune des deux galactases stéréo-isomères. La connaissance de pareils systèmes de diastases douées de propriétés complémentaires peut être extrêmement précieuse pour les recherches chimiques, car on peut demander aux ferments solubles, considérés comme réactifs spécifiques d'un certain groupement d'atomes, des indications que ne saurait fournir jusqu'ici aucune méthode chimique.

Nous venons de voir cesser l'anomalie que présentaient vis-à-vis de la loi dont nous poursuivons la vérification les dérivés du d-galactose. Le lactose et le méthyl-d-galactoside β sont homologues, ils ne sont pas hydrolysés par l'émulsine, mais ils le sont par la d-galactase de l'*Aspergillus niger* : d'après les expériences de Fischer, ils ne le seraient plus vis-à-vis de la lactase des levures.

Fischer¹ a opéré sur des grains de képhyr et des levures de lactose; les grains de képhyr mis à macérer dans l'eau lui ont donné un liquide diastasifère très peu actif; les levures de lactose, par simple macération dans l'eau, n'ont pas fourni de diastase en quantité appréciable: il a fallu pour en obtenir employer la levure broyée. Les mélanges diastasiques ainsi préparés ont dédoublé le lactose, mais non le méthyl-d-galactoside; il m'a semblé que ce résultat pourrait tenir d'une part à la faiblesse des extraits diastasiques mis en œuvre, d'autre part à la résistance plus grande du méthyl-d-galactoside, et peut-être aussi à l'influence de l'antiseptique (toluène) ajouté au mélange. J'ai repris ces expériences en employant les levures de lactose connues sous le nom de levures de Duclaux, de Kayser, d'Adametz; les résultats ont été les mêmes dans les trois cas. Les levures cultivées dans des boîtes de verre sur du petit lait solidifié par la gélose, raclées, lavées à l'eau stérile, et ajoutées à des solutions à 10 0/0 des galactosides, ont donné : avec le méthyl-d-galactoside α , pas de fermentation; avec le lactose et le méthyl-d-galactoside β , des

1. FISCHER, B, XXVII, p. 3479.

fermentations actives. Dans le cas du lactose, la fermentation s'est déclarée en moins d'une heure; elle a été dès le début tumultueuse; au bout de 24 heures elle s'est apaisée, et après 48 heures le dégagement de CO_2 était devenu très lent, pour cesser complètement le 4^e jour. Dans le cas du méthyl-d-galactoside la fermentation a été lente à s'établir, elle n'a commencé à donner un dégagement appréciable d'acide carbonique qu'au bout de 18 heures, elle n'a jamais pris par la suite un caractère tumultueux; par contre, au bout de cinq jours, elle ne manifestait pas encore de ralentissement sensible, elle n'a cessé d'être apparente qu'au 12^e jour. Au bout de deux semaines les liquides ont été repris : dans les tubes à lactose tout le sucre avait disparu, à 1 ou 2 centièmes près : les contenus des tubes à méthyl-d-galactoside β ont été réunis et soumis à des distillations fractionnées pour concentrer l'alcool, ils ont fourni 15 c. c. d'un liquide dont la densité à 15°, prise par pesée, était égale à 0,9835, ce qui correspondrait à la présence de 1,49 d'alcool éthylique pur; cet alcool est nécessairement mélangé d'alcool méthylique dans une proportion voisine de 1/3, et la quantité trouvée provient de la destruction d'environ 2^{gr},4 de méthyl-d-galactoside sur 3 grammes mis en œuvre.

Les levures essayées sont donc capables de faire fermenter le méthyl-d-galactoside β ; il en résulte qu'elles doivent sécréter une diastase capable de l'hydrolyser : l'expérience suivante montre qu'il en est bien ainsi; elle a été faite avec une solution de ferment obtenue en traitant comme il a été dit plus haut un mélange des trois levures broyées.

EXP. IX Corps mis en expérience.	Durée du contact.	Galactoside dédoublé 0/0.
Lactose.	1 mois	65
Méthyl-d-galactoside α .	—	0
Méthyl-d-galactoside β .	—	37

De tout ce qui précède, nous pouvons conclure que les dérivés du d-galactose ne présentent pas plus que ceux du d-glucose des incompatibilités avec la loi de Fischer, telle que nous l'avons énoncée, et que dans les limites où elle a pu être soumise au contrôle de l'expérience, cette loi apparaît dégagée de toute contradiction.

III

La classification des diastases et des glucosides dédoublés par elles, que nous avons donnée plus haut, doit être corrigée et s'établit de la façon suivante; à côté du nom de chaque diastase figurent les glucosides qu'elle hydrolyse.

	Glucosides.	Pouv. rot. α D.
Invertine.....	Saccharose	
	Raffinose	
	Gentianose	
Maltase.....	Maltose	+ 140°
	Méthyl-d-glucos. α	+ 157°5
	Ethyl-d-glucos. α	+ 150,5
	Glycérin-glucos. α	+ 160
	Tréhalose	+ 190
	Benzyl-glucos. (1 isom.) ?	?
	Amygdaline	partl.
Emulsine.....	Amygdaline	— 36,3
	Nitrile amygdalique	— 26,9
	Coniférine	— 66,9
	Arbutine	gauche.
	Picéine	— 84
	Salicine	— 62,56
	Hélicine	— 60,43
	Esculine	?
	Méthyl-d-glucos. β	— 31,8
	Glycérin-glucos. β	gauche.
	Benzyl-glucos. β	?
	Thymol	?
— β Lactase....	Lactose	
	Méthyl-d-galactose β	
α Lactase.....	Méthyl-d-galactose α	

Pour les glucosides hydrolysés par la maltase et l'émulsine, nous avons inscrit en face de chacun de ceux qui sont connus à l'état pur et cristallisé, son pouvoir rotatoire. Si on fait abstraction de l'amygdaline, glucoside azoté dont la construction moléculaire est encore incertaine, on voit que les glucosides dédoublés par la maltase ont un pouvoir rotatoire droit supé-

rieur à celui du glucose (+ 52°,5), tandis que ceux qui sont dédoublés par l'émulsine ont un pouvoir rotatoire gauche.

Si nous nous reportons à l'hypothèse de Simon que nous avons exposée en commençant, nous voyons qu'il existe entre les données qui résultent de la façon dont les glucosides réagissent vis-à-vis des diastases et celles qu'on pouvait induire en faisant appel aux seules considérations théoriques, un accord qui valait d'être signalé.

Pasteur avait montré le rôle considérable que joue l'isomérisation optique, et par conséquent la structure stéréochimique qui en est la traduction, dans les phénomènes chimiques de la vie des cellules; nous voyons aujourd'hui ce rôle se poursuivre dans le domaine des actions diastasiques. Chaque diastase agit sur un type stéréochimique déterminé, il est très naturel d'admettre que cela tient précisément à ce qu'elle est elle-même bâtie sur un type homologue.

ETUDES SUR L'HÉMOLYSE

PAR LE D^r HENRI LANDAU (DE VARSOVIE)

Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.

Dans les recherches faites jusqu'à présent par divers auteurs au sujet de l'hémolyse, on s'est bien peu occupé des animaux à sang froid. Or, la façon dont ils se comportent à l'égard de l'hémolyse présente une question très intéressante à étudier, non seulement par elle-même, mais aussi en raison du fait que ces animaux possèdent des globules rouges nucléés. Jusqu'ici, on n'est pas encore fixé sur la manière dont se comportent les noyaux des érythrocytes en présence des hémolysines, car les opinions des auteurs divergent sur ce point. Ainsi, la plupart des savants, — je ne mentionnerai ici que les noms de Bordet¹, von Dungern², — en injectant du sang des oiseaux (poules, pigeons, oies) aux lapins ou aux cobayes, ont obtenu une hémotoxine qui dissout, tant *in vitro* qu'*in vivo* (dans la cavité abdominale), le protoplasma seul des globules rouges, sans jamais attaquer les noyaux; d'après Bordet, ces derniers deviendraient bien vite, dans la cavité abdominale des animaux immunisés, la proie des macrophages. Par contre, Krompecher³ est arrivé à des résultats tout opposés : après avoir injecté pendant un temps prolongé (de 2 à 3 semaines) du sang de grenouille au lapin, il a obtenu un sérum qui dissout les hématies de la grenouille dans leur totalité, c'est-à-dire protoplasmas et noyaux; ces derniers présentaient d'abord à leur périphérie des espèces de bourgeons, puis ils se segmentaient, ou bien se dissolvaient, ou encore se transformaient en longs filaments qui disparaissaient peu à peu. Si d'autres auteurs n'avaient pas observé les mêmes faits, c'est, pense Krompecher, parce qu'ils avaient expérimenté sur des animaux trop rapprochés dans l'échelle zoologique.

Les résultats obtenus par Krompecher nous ont paru intéressants à contrôler, ou respectivement à compléter par des expé-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 276.

2. *Münch. med. Wochenschr.* 1899, 13-14.

3. *Centralbl. f. Bakteriol.* 1900, XXVIII, p. 588.

riences sur d'autres animaux de la même catégorie, et, lorsque M. le Pr Metschnikoff nous proposa d'étudier la question dans son laboratoire, c'est avec empressement que nous nous sommes rendus à son invitation.

Nos expériences ont porté sur des grenouilles, notamment sur l'espèce verte (*Rana esculenta*)¹, puis sur les tortues de terre (*Testudo graeca*); le lapin fournissait le sérum hémolytique. Habituellement, on injectait dans la veine auriculaire du lapin soit du sang défibriné desdits animaux, soit du sérum seul, soit les globules obtenus par la centrifugation et lavés à plusieurs reprises avec la solution physiologique de sel. Ces préparations ayant été injectées en quantité plus ou moins considérable, on retirait, au bout d'un certain temps, du sang de l'animal soumis à l'expérience, et on le faisait agir sur les globules de la grenouille ou de la tortue. On examinait le phénomène macroscopiquement (dans le tube à essai) et microscopiquement (dans une goutte pendante), en déterminant la force hémolytique par la quantité minimum de sérum nécessaire pour dissoudre un centimètre cube de l'émulsion du sang à 5 0/0 dans une solution de sel marin à 0,85 0/0 en une heure, à la température de la chambre. Pour ramener le contenu de divers tubes à volume égal, on y ajoutait de la solution de chlorure de sodium.

Les résultats de nos expériences, dont le nombre s'élève à près de trente, sont assez homogènes et concordants entre eux. Tandis que le sérum du lapin normal agglutine faiblement les globules rouges de la grenouille et de la tortue, et ne les dissout point (même en proportion de 10 parties de sérum pour 1 partie de sang), — nous obtenions, six jours après une injection unique de 4 c. c. de sang — un sérum à action nettement hémolytique. A part certaines particularités individuelles, l'action du sérum croît proportionnellement au nombre d'injections reçues par l'animal, à la quantité de sang ou de ses éléments injectés, enfin au laps de temps écoulé depuis la première injection. Les plus actifs des sérums obtenus dans nos expériences dissolvaient le sang de grenouille ou de tortue en proportion de 1/10, en une heure de temps et à la température ordinaire. (La température de

1. Krompecher n'indique pas dans son travail l'espèce de grenouille employée; quant à nous, nous avons dû nous restreindre à l'espèce *R. esculenta*, vu la grande difficulté de se procurer la *R. temporaria*.

37° accélère l'hémolyse). En moyenne, nos sérums dissolvaient en proportion de 1/4.

Outre le pouvoir dissolvant, les sérums obtenus par nous présentaient, pour le sang des animaux respectifs, des propriétés agglutinantes et précipitantes. Toutefois, l'agglutination ne se produisait bien nettement qu'avec le sérum des animaux préparés par l'injection des globules seuls, dépourvus de sérum, et on ne l'observait pas du tout, si l'injection avait été faite avec du sérum sanguin seul. Si c'est le sang en totalité qui avait servi aux injections, les phénomènes de l'agglutination offraient un caractère intermédiaire entre les deux catégories précédentes. Autrement dit, le stade agglutinatif antérieur à l'hémolyse était le plus accentué sous l'influence des sérums provenant des animaux de la première catégorie, et n'apparaissait point avec le sérum des animaux de la seconde catégorie. Le sérum actif, ajouté au sérum de l'espèce animale pour le sang de laquelle il constitue un agent toxique, produit dans ce sang un trouble, et, après un certain temps, il se dépose au fond du vase des flocons très fins. Cette propriété précipitante est inhérente aux sérums de tous les animaux immunisés, quel que soit l'agent de l'immunisation : sang total ou ses éléments particuliers.

Conservés à la glacière pendant 24 heures, les sérums gardaient leur pouvoir hémolytique, qui ne disparaissait habituellement qu'au bout de 4 ou 5 jours. Une élévation de température à 55°, pendant une demi-heure, annulait le pouvoir dissolvant du sérum vis-à-vis des globules rouges, sans diminuer son action agglutinante, qui devenait même plus évidente. L'addition d'une certaine quantité de sérum frais de lapin neuf au sérum chauffé restituait complètement le pouvoir hémolytique à ce dernier.

L'examen microscopique nous a démontré que les globules rouges de la grenouille, aussi bien que de la tortue, subissent, sous l'influence du sérum actif, des modifications identiques et constantes : le globule change sa forme ovale en sphérique, le noyau devient plus net et se déplace du centre vers la périphérie de la cellule; en même temps, le globule perd progressivement sa coloration, devient de plus en plus pâle, enfin, il n'en reste plus qu'un mince rebord décoloré autour du noyau

fort accusé. Au bout d'un certain temps, habituellement après une heure, le rebord disparaît à son tour, et l'on ne trouve à ce moment qu'un dépôt abondant, formé d'amas de granulations et fort semblable aux amas de bactéries agglutinées et des noyaux très nombreux. Ces derniers sont entassés par places en amas assez considérables et répondent par leur quantité au nombre des hématies contenues dans la préparation donnée; leurs forme et structure ne diffèrent en rien des noyaux à l'état normal, leurs contours sont nets; ils se colorent parfaitement avec les couleurs basiques. Même après avoir tenu les préparations à l'étuve pendant 24 heures à la température de 37°, c'est-à-dire dans les conditions les plus favorables à l'hémolyse, nous n'avons pas vu disparaître les noyaux, ni observé aucune des modifications indiquées par Krompecher. C'est seulement après un temps plus prolongé (48 heures et au delà) que les noyaux commençaient à s'altérer: ils se ratatinaient ou se gonflaient, mais nous avons vu les mêmes phénomènes se produire pour les noyaux des hématies conservées pendant un temps prolongé dans une solution de chlorure de sodium à 0,85/0.

Vu la concordance parfaite des résultats de toutes nos expériences, nous nous bornons à rapporter seulement plusieurs exemples les plus caractéristiques.

*Lapin n° 12*¹. Le 24 mai 1902, on a injecté dans la veine auriculaire 1,5 c. c. de sang défibriné de grenouille². Poids = 1.500 grammes. — Le 5 juin 1902, injection de 3 c. c. de sang de grenouille. Poids = 1.590 grammes. — Le 12 juin, injection de 7 c. c. Poids = 1.655 grammes. — Le 21 juin,

1. Il faut remarquer que le lapin n'est pas indifférent à l'introduction dans son organisme, resp. dans son système vasculaire, du sang ou du sérum de grenouille ou tortue, qui sont des agents violemment toxiques pour ses globules rouges. Les doses maximales supportées par les lapins de nos expériences étaient 9 c. c. de sang ou bien la quantité correspondante de globules, ou 8 c. c. de sérum. Certains animaux succombaient même après l'introduction de quantités bien plus faibles, telles que 3 ou 4 c. c., ce qui tient naturellement à une moindre résistance individuelle. L'autopsie de ces lapins ne révélait habituellement qu'une légère tuméfaction de la rate. Le sang retiré du cœur était stérile. Assez souvent, nous constatons aussi une inflammation et de l'œdème autour du point d'injection, et ces lésions se terminaient par la nécrose et la chute de la portion correspondante de l'oreille. Krompecher a trouvé que les lapins succombent constamment, si l'injection de sérum de grenouille dépasse 1 c. c.; c'est ce que nos expériences ne confirment point.

2. Nous obtenions le sang des animaux (tant grenouilles que tortues) de la façon suivante. Après avoir desséché la surface cutanée, on séparait la tête du tronc à l'aide des ciseaux passés à la flamme, puis ayant recueilli le sang dans un vase stérilisé, nous le défibrinions en le battant énergiquement avec une baguette.

injection de 7 c. c. Poids = 1.360 grammes. — Le 30 juin 1902, saignée (de la carotide). — Le sérum dissout le sang de grenouille (en émulsion à 5 % dans une solution de NaCl à 0,85 %) en une heure, dans la proportion d'une partie de sérum pour 5 parties de sang, après l'avoir agglutiné; il se produit un dépôt abondant. Les noyaux restent intacts. — Le 8 juillet, injection de 8 c. c. de sang de grenouille. Poids = 1480 grammes. — Le 18 juillet, saignée. Le sérum dissout le sang de grenouille dans la proportion de 1 %, avec conservation des noyaux. Autres phénomènes comme précédemment.

Lapin n° 13. Le 22 mai 1902, on a injecté dans la veine auriculaire 2,5 c. c. de sérum de grenouille. Poids = 1.875 grammes. — Le 7 juin, injection de 4 c. c. de même sérum. Poids = 1.760 grammes. — Le 23 juin, injection de 6 c. c. Poids = 1750 grammes. — Le 4 juillet, saignée. Le sérum dissout le sang de grenouille (5 % dans une solution de NaCl à 0,85 %) au bout d'une demi-heure dans la proportion de 1 pour 4, sans produire d'agglutination préalable. Précipité fort abondant; conservation des noyaux. Le 10 juillet 1902, injection de 7 c. c. de sérum de grenouille. Poids = 1,850 grammes. — Le 25 juillet, saignée. Le sérum dissout de même les hématies de la grenouille dans la proportion de 1 pour 4 et attaque le protoplasma seul sans modifier le noyau.

Lapin n° 23. Le 15 juin 1902, on a injecté dans la veine auriculaire des globules provenant de 6 c. c. de sang de tortue, suspendus dans la solution physiologique de NaCl (les globules avaient été séparés par la centrifugation et puis lavés à plusieurs reprises dans la solution de sel). Poids = 1810 grammes. — Le 28 juin, injection de globules provenant de 7 c. c. de sang de tortue. Poids = 1.850 grammes. — Le 6 juillet 1902, injection des globules provenant de 9 c. c. de sang de tortue. Poids = 1.850 grammes. — Le 12 juillet, injection de la même quantité de globules. Poids = 1.740 grammes. — Le 17 juillet, saignée. Le sérum obtenu agglutine fortement les globules rouges de la tortue et les dissout dans la proportion de 1 pour 4 en une heure, à la température ordinaire. Les noyaux restent intacts. Le 18 juillet, injection de globules retirés de 9 c. c. de sang de tortue. Le 30 juillet, saignée. Le sérum a un pouvoir hémolytique de 1:5 et n'attaque pas les noyaux.

De ce qui vient d'être rapporté, il s'ensuit que, malgré le degré de préparation de nos animaux, bien supérieur à celui des lapins de Krompecher, la karyolyse a absolument fait défaut. Le même fait a été constaté pour l'hémolyse provoquée *in vivo*. En injectant, dans la cavité abdominale des animaux préalablement préparés, de 1 à 2 c. c. de sang défibriné de grenouille ou de tortue (ou mieux encore la même dose de globules suspendus dans une solution physiologique de sel marin), nous ne trouvions, dans l'exsudat de la cavité retiré de 15 à 20 minutes après l'injection — que des globules peu nombreux et notable-

ment décolorés à côté de nombreux noyaux soit libres, soit contenus dans des leucocytes mononucléaires. Après avoir injecté la même quantité de sang dans la cavité abdominale d'un lapin normal, on trouve au bout de 2 heures au plus, un nombre considérable de globules intacts¹.

*
* *

Comme Krompecher² l'avait déjà remarqué, une goutte de sang de grenouille ajoutée à une goutte de sang de lapin amène la dissolution rapide des globules rouges de ce dernier; mais, si l'on mélange le sang de grenouille au sang d'un lapin qui a préalablement reçu des injections de sang ou de sérum de grenouille, la dissolution n'a pas lieu, et les globules ne font que s'agglutiner. En examinant de plus près les réactions qui se produisent entre le sang des animaux à sang froid et les éléments du sang de lapin, nous nous sommes convaincu que le sérum des premiers (grenouille aussi bien que tortue³) possède des propriétés nettement hémolytiques envers les globules rouges du lapin. Une partie de ce sérum suffit pour dissoudre complètement les globules contenus dans 15 ou même 20 parties de sang de lapin (en émulsion à 5 % dans la solution physiologique de sel), au bout de quelques minutes.

D'après les recherches bien connues de Bordet, d'Ehrlich et Morgenroth sur l'origine des antihémolysines, il était à prévoir que le sérum des lapins auxquels on avait inoculé du sang ou du sérum de grenouille ou de tortue aurait le pouvoir de neutraliser l'action toxique du sérum desdits animaux sur les hématies du lapin; autrement dit, à côté du pouvoir hémolytique envers le sang de l'espèce animale qui a fourni le vaccin, le sérum en question possède un pouvoir antihémolytique envers le sang de leur propre espèce. C'est en effet ce que l'expérience confirme: l'addition d'une partie de nos sérums actifs à une partie de sérum de grenouille ou resp. de tortue suffit pour indiquer

1. Il serait intéressant de savoir comment se comportent, vis-à-vis des noyaux des globules rouges, les sérums provenant des animaux à hématies nucléées. Il n'existe à ce sujet dans la science aucune donnée. Certes, Nolf (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 1900, p. 311) a injecté le sang des oiseaux (poules) aux oiseaux (pigeons), mais il n'obtenait qu'un sérum agglutinant sans action hémolytique.

2. *Loco cit.*

3. En ce qui concerne le sérum de grenouille, le fait est connu depuis longtemps. Voy. Landois, *Traité de Physiologie*, 1900, p. 26.

une influence antitoxique; mais, pour neutraliser complètement la toxicité dudit sérum, il faut employer de 12 à 15 parties de préparation antihémolytique.

*
* *

On sait que les sérums actifs envers les cellules d'une espèce animale donnée et obtenus par voie d'immunisation de ces animaux peuvent agir également sur les cellules d'autres espèces plus ou moins rapprochées (Bordet¹, Ehrlich et Morgenroth², etc.); de même le sérum toxique pour certaines cellules de l'animal donné peut attaquer d'autres éléments cellulaires du même organisme (von Dungern³, Moxter⁴).

Nos sérums hémolytiques, examinés à cet égard, ne se sont pas montrés tout à fait spécifiques. Il est vrai que les sérums actifs envers les globules rouges de la tortue n'attaquaient point les globules rouges de la grenouille, et inversement; mais chacun de ces deux sérums agissait sur le sang d'espèces plus rapprochées; ainsi, le sérum actif pour les hématies de la grenouille dissolvait les hématies du crapaud (*Bufo vulgaris*), du triton (*Triton cristatus*), de la salamandre (*Salamandra maculata*), de l'axolotl (*Siredon pisciformis*), et le sérum spécifique pour les globules rouges de la tortue terrestre agissait également sur le sang de la tortue d'eau (*Emys Europæa*). (Le sérum du lapin neuf se comporte envers les globules des animaux énumérés à peu près de même qu'avec le sang de grenouille ou de tortue de terre, c'est-à-dire qu'il ne les dissout point; seuls les globules rouges du crapaud semblent être sensibles, car ils se dissolvent dans le sérum du lapin normal, quand on met en contact une partie de sang et 10 parties de sérum). Toutefois, l'action des sérums spécifiques sur le sang des animaux ci-dessus mentionnés est en général bien plus faible que l'action des mêmes sérums sur le sang des animaux des espèces qui ont servi à l'immunisation des lapins; en outre cette action subit d'importantes oscillations individuelles, comme on le voit dans le tableau ci-joint. Quant à la marche du processus hémolytique dans ces cas de non-spécificité, elle

1. *Ann. de l'Institut. Pasteur*, 1899, p. 273.

2. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1901, p. 571.

3. *Munch. med. Wochenschr.*, 1899, p. 1228.

4. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1900, p. 61.

ne se distingue en rien de ce que nous avons noté pour la grenouille et la tortue de terre : le protoplasma des hématies est seul attaqué, tandis que le noyau reste intact.

	Proportion à laquelle le sérum spécifique pour la tortue de terre dissout le sang (émul. 5 %) de :		Proportion à laquelle le sérum spécifique, pour les globules rouges de la grenouille dissout le sang (émulsion 5 %) de :				
	Tortue de terre.	Tortue d'eau.	Grenouille.	Crapaud.	Triton.	Salamandre.	Axolotie.
1.	1 : 4	1 : 4	1 : 5	2 : 1	3 : 4	3,5 : 1	5 : 1
2.	1 : 4	2 : 1	1 : 8	4 : 1	6 : 1	7 : 1	8 : 1
3.	1 : 5	2 : 1	1 : 10	3 : 1	4 : 1	4,5 : 1	6 : 1
4.	1 : 4	1,5 : 1	1 : 4	1 : 1	2 : 1	2,5 : 1	4 : 1

En outre, les quatre dernières rubriques pourraient nous amener à conclure qu'ils existe un rapport constant entre le degré de parenté zoologique des espèces animales données et l'action qu'un sérum hémolytique exerce sur leur sang, de sorte qu'en se basant sur ce facteur, il serait possible de déterminer jusqu'à un certain degré le rang occupé par une espèce donnée dans la classification zoologique.

L'imparfaite spécificité de nos sérums actifs existait aussi en ce qui regarde la propriété précipitante de ces sérums ; ainsi, le sérum spécifique pour le sang de grenouille, qui provoquait un précipité abondant dans le sérum de grenouille, précipitait de même le sang des autres batraciens cités (crapaud, etc.). Il n'existait pour les deux cas que des différences quantitatives, c'est-à-dire que le dépôt formé dans le sang des derniers était moins abondant et demandait, pour se produire, une proportion plus notable de sérum actif.

Même résultat pour le sérum actif contre le sang de la tortue de terre. Cette non-spécificité des précipitines prouve qu'il existe une parenté biologique entre les albumines provenant des diverses espèces animales, de même qu'entre les diverses albumines d'une même espèce, ce qui, du reste, a été déjà plus d'une fois constaté et, tout dernièrement, Linossier et Lemoine ont obtenu des résultats analogues aux nôtres.

OBSERVATIONS

SUR LES MOUSTIQUES DES ENVIRONS D'ALGER

PAR MM. EDMOND SERGENT ET ÉTIENNE SERGENT

Ayant l'intention d'étudier et de combattre le paludisme en Algérie, nous avons pensé que l'étude des moustiques de ce pays s'imposait d'abord. Nous avons limité nos recherches, cette année-ci, à une zone d'environ 15 kilomètres de rayon autour d'Alger, où nous avons recueilli des Culicides à l'état larvaire ou adulte pendant les différentes saisons.

La région explorée comprend le massif de la Bouzaréa, fait de gneiss et de micaschistes, qui descend rapidement de 400 mètres d'altitude jusqu'à la mer, au nord et à l'est. Sur le flanc est s'étage la ville d'Alger. À l'ouest et au sud, les roches cristallophylliennes disparaissent sous les terrains calcaires qui constituent le Sahel algérien, chaîne littorale peu élevée et coupée de ravins, qui sépare la vaste plaine de la Mitidja de la mer.

Les moustiques capturés dans cette région appartiennent à 9 espèces, dont 5 connues et 3 nouvelles.

Ce sont :

Anopheles maculipennis (Meigen)¹;

Stegomyia fasciata (Fabr.);

Culex fatigans (Wiedemann)²;

Culex pipiens (Linné);

Culex spathipalpis (Rondani);

1. Nous avons observé que les *A. maculipennis* algériens sont plus petits que ceux des environs de Paris. (En Algérie, femelles : 5 mm. 5 sans la trompe; mâles, 4 mm. 1/2 à 5 millimètres. En France, femelles : 6 mm. 1/2 à 7 mm. 1/2; mâles, 6 à 7 millimètres.)

2. Pour déterminer le *c. fatigans*, espèce très variable, nous nous sommes servis des caractères suivants, qui sont constants : Le siphon respiratoire de la larve est très long et étroit. Le rapport entre la plus petite largeur et la plus grande longueur de ce siphon est, en moyenne, de 1 à 15. [Chez le *c. pipiens*, il est de 1 à 7]. Chez la femelle, la première cellule sous-marginale de l'aile est trois fois plus longue que sa tige; chez le mâle, elle est deux fois plus longue que sa tige. La nervure transversale postérieure de l'aile est éloignée de la transversale moyenne de 1 fois 1/2 à 2 fois 1/2 sa propre longueur.

Culex lateralis (Meigen)¹.

Les espèces nouvelles sont :

Anopheles Algeriensis, n. sp. Theobald.

Culex Sergentii, n. sp. Theobald.

Culex Mariæ, n. sp.

Anopheles algeriensis. Theobald.

Cette espèce nouvelle est voisine d'*A. bifurcatus*. Elle semble en être la forme vicariante en Algérie. Elle en diffère par les caractères suivants : 1° taille moindre; femelle, 3 mm. 1/2 à 4 mm. 1/2, au lieu de 5 à 5 mm. 1/2; mâle, 3 à 4 millimètres au lieu de 6; 2° les nervures transversales des ailes sont différentes : chez *A. Algeriensis*, les nervures transversales antérieure et postérieure sont sur une même ligne dans les deux sexes. Chez *A. bifurcatus* femelle, la postérieure est interne; chez le mâle, c'est l'antérieure qui est interne; 3° les écailles latérales des nervures des ailes sont plus longues et plus minces chez *A. algeriensis* que chez *A. bifurcatus*.

Les larves de *A. Algeriensis* présentent les particularités suivantes : les soies médianes et angulaires de la tête sont tantôt absolument dépourvues de ramuscules comme chez *A. bifurcatus* (18 sur 46 larves examinées); tantôt garnies de poils courts, comme chez *A. superpictus* (3 sur 46) examinées); ou bien les soies médianes sont simples, et les angulaires se divisent en 2 ou parfois 3 rameaux (25 sur 46 examinées).

Dans les œufs, les chambres à air sont très volumineuses. Elles occupent plus des 2/3 de la longueur totale de l'œuf. Après la ponte dans les bocaux de laboratoire, les œufs sont disposés irrégulièrement à la surface de l'eau, parfois en étoile, parfois parallèles entre eux, parfois isolés.

Culex Sergentii. Theobald.

Cette espèce est voisine de *C. geniculatus* Olivier (= *C. hortensis* Ficalbi). Elle se caractérise par des bandes blanches apicales se continuant avec des taches blanches latérales triangulaires, sur chaque segment de l'abdomen, tandis que chez *C. geniculatus*, les bandes des sommets de chaque segment sont simples, sans expansions latérales (Theobald).

1. Chez les *C. lateralis* que nous avons capturés en Algérie, les écailles pâles qui couvrent chaque côté du mesonotum sont plus dorées, d'après Theobald, que chez les spécimens européens.

FEMELLE. — La tête est couverte d'écailles fines, blanches et jaunâtres, et sur les côtés de la nuque seulement d'écailles plates blanches. Le rebord des orbites est marqué par des écailles blanches. Les antennes, les palpes et la trompe sont d'un noir bleu.

Les *palpes* se terminent à leur 3^e article, plus grand que les autres ; il n'y a pas de 4^e petit article.

Le *thorax* est brun jaune, avec des écailles courbes blanc jaunâtres. Il ne porte aucun dessin.

L'*abdomen* est noir. Chaque segment a une mince bande blanche apicale, s'élargissant sur les côtés en triangles blancs dont le sommet est dirigé vers la tête. La face inférieure de l'abdomen est entièrement blanche.

Les *pattes* sont bleu-noir, sauf à la base et à la face interne des fémurs, qui sont jaunâtres. Il y a quelques écailles blanches à l'articulation du fémur et du tibia et à celle du tibia et du métatarse. Les ongles sont égaux et simples à toutes les pattes.

Les *ailes* ne sont pas tachetées. La première cellule sous-marginale est deux fois plus longue que sa tige. Elle est plus longue et plus mince que la deuxième cellule postérieure. Celle-ci a la même longueur que sa tige. Les nervures transversales antérieure et moyenne sont sur la même ligne, la transversale postérieure est en dedans de la moyenne à une distance de 1 fois $1/2$ à 2 fois $1/2$ sa propre longueur.

La longueur est de 3 mm. $1/2$ à 4 mm. $1/2$ sans la trompe, 5 mm. $1/2$ à 6 millimètres avec la trompe.

Culex Mariae n. sp.

Cette nouvelle espèce se caractérise par un anneau blanc à la trompe (surtout chez le mâle); les derniers articles du tarse blancs; des anneaux blancs sur les divers segments des pattes; un mélange d'écailles blanches et noires sur les nervures des ailes, les pattes, la trompe.

FEMELLE. — Tête noire, avec de nombreuses écailles minces courbes dorées — des écailles droites bifurquées — et des écailles plates blanches, celles-ci surtout sur les côtés de la nuque. Autour des yeux, qui sont noirs, une rangée d'écailles blanches. Sur le front, noir, écailles blanches et écailles minces dorées. Antennes d'un brun-jaune, avec des anneaux blancs à la base et au sommet

de chaque article, ceux du sommet étant plus étroits que ceux de la base. Les *palpes* sont très courts, noirs. Le 3^e article a un anneau blanc à la base et le sommet tout blanc. Il n'y a pas de 4^e petit article. La *trompe*, noire, est pailletée d'écailles blanches surtout à la partie médiane, où elles forment un anneau un peu diffus.

Le *thorax*, cuivré sombre, est couvert d'écailles dorées minces, d'un petit nombre d'écailles blanches et de poils noirs. Il ne présente aucun dessin. Les *flancs*, d'un brun jaunâtre, portent des écailles blanches disposées par amas. Le *scutellum* est revêtu d'écailles dorées et blanches peu denses, et est bordé d'une rangée de poils bruns. Le *metanotum*, cuivré, est nu.

L'*abdomen* est noir. Le 1^{er} segment est presque partout couvert d'écailles blanches disposées sans ordre, les autres segments ont une bande blanche basale peu considérable qui s'élargit en deux taches latérales triangulaires, ce qui détermine un trapèze noir apical. La face ventrale est entièrement blanche. Les poils qui se dressent au bord de chaque segment sont dorés.

Les *hanches* sont jaunâtres, couvertes par places d'écailles blanches. Les *pattes* sont noires, pailletées d'écailles blanches, sauf la face interne du fémur qui est jaunâtre. Les derniers articles du *tarse* aux 3 paires sont entièrement blancs (ceci est moins net à la 1^{re} paire). Les autres segments des pattes ont tous un anneau blanc basal et un anneau blanc apical, sauf l'avant-dernier article tarsal des 3 paires, et l'antépénultième de la 1^{re} paire, qui n'ont pas d'anneau apical. La formule indiquant les dents des ongles est : 1.1 — 1.1 — 1.0.

Les *ailes*, non tachetées, ont leurs nervures longitudinales revêtues d'écailles noires et blanches mêlées. La frange est blanche. La 1^{re} cellule sous-marginale, de même longueur que la 2^e postérieure, est plus étroite qu'elle, plus éloignée de la base de l'aile, et plus rapprochée de l'apex. La 1^{re} sous-marginale a la même longueur que sa tige, la 2^e postérieure est plus longue que la sienne. La nervure transversale surnuméraire (antérieure) est très courte et parfois difficile à distinguer; elle est au même niveau que la nervure moyenne. La postérieure est en arrière à une distance égale à sa propre longueur. Les *haltères* sont jaunâtres.

MALE. — Les *antennes*, noires brunes, avec leurs deux derniers

articles non plumeux, plus longs que les autres, sont moins longues que la *trompe*. Les *palpes* noirs sont de la même longueur que la *trompe*. Il y a un anneau blanc à la base de chacun des 2 derniers articles, qui ne sont presque pas renflés. Le 1^{er} article porte à sa partie moyenne un large anneau jaunâtre, coupé par un mince anneau noirâtre autour de l'étranglement. De longs poils bruns partent de la partie terminale du 1^{er} article et des 2 autres articles. La *trompe*, noire, a un large anneau blanc à sa partie moyenne. Le lobe basal de l'appareil génital externe est très long, et poilu.

La formule qui exprime le nombre de dents des ongles est : 2.1 — 1.1 — 0.0.

Dimensions: Femelle, 5 m. m. 1/2 sans la *trompe*, 7 1/2 avec la *trompe*.

Mâle, 4 m. m. à 5 1/2 sans la *trompe*, 5 1/2 à 7 1/2 avec la *trompe*.

La femelle de cette espèce, très sanguinaire, pique en plein jour.

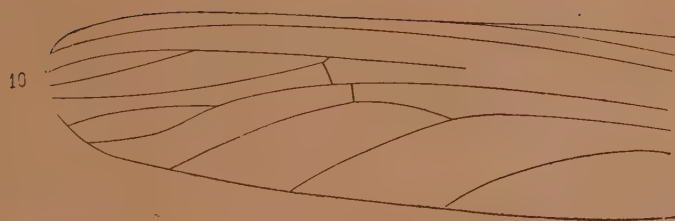
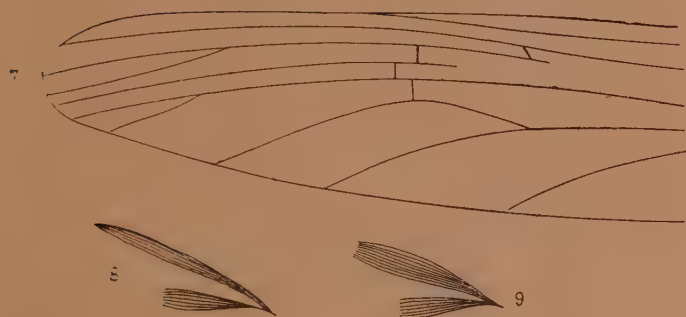
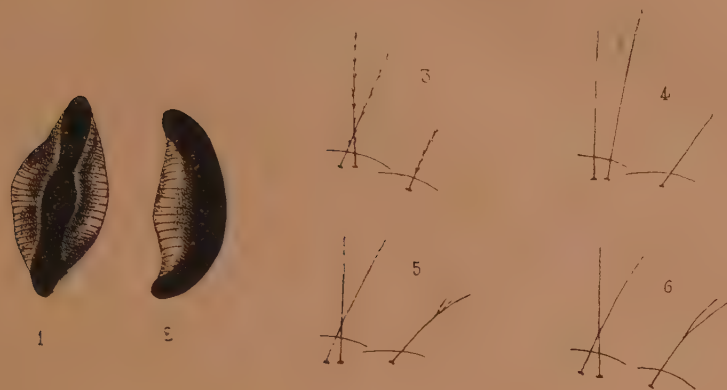
Les larves de *C. Marie* ont un tube respiratoire presque aussi large à son extrémité apicale qu'à sa base.

Influence des saisons. — Il n'y a, à Alger, à proprement parler, que deux saisons : l'hiver, frais et pluvieux, et l'été, chaud et sec. C'est durant cette dernière saison que pullulent les moustiques, mais ils hivernent à l'état adulte et à l'état larvaire.

On trouve toute l'année, en certains points, des larves d'*Anopheles*, de *Culex spathipalpis*, de *Culex pipiens*; et nous avons assisté, au mois de février, à la sortie de leurs nymphes de plusieurs *Anopheles*. D'après nos observations, les premières pontes de l'été ont lieu dans la première quinzaine de juin, les dernières pontes dans la première quinzaine d'octobre.

Distribution des espèces. — On peut ranger ces différents moustiques, d'après l'habitation de leurs larves, en plusieurs catégories :

1) La larve de *C. Marie* n'a été pêchée que dans les trous d'eau salée des falaises de calcaire cristallin. Cette eau provient des grandes lames que les tempêtes d'équinoxe jettent par-dessus les rochers de la côte, et des pluies. En été, où il ne pleut jamais, l'évaporation amène un fort degré de concentration des sels de cette eau.



F. Sargent del.

V. Roussel sc.

Au mois d'août, époque à laquelle il y avait beaucoup de larves dans ces eaux, une analyse qu'a bien voulu faire faire M. G. Bertrand dans son laboratoire y révélait une proportion de 35 grammes de chlorures pour 1 litre. Au même moment, l'eau de la Méditerranée, puisée en pleine mer, contenait 34 grammes de chlorures par litre.

Ces larves vivaient donc dans une solution de chlorures presque deux fois plus concentrée que l'eau de mer.

Elles pouvaient vivre d'ailleurs dans des solutions moins fortes : les premières pluies d'octobre ayant rempli ces trous d'eau, les chlorures étant dans la proportion de 43 grammes par litre, les larves vivaient fort bien.

2) Les moustiques dont les larves ont été capturées un peu partout sont *C. pipiens* L., *C. spathipalpis*, qui se contentent des flaques d'eau les plus sales. Les larves de *C. Sergentii* et de *C. lateralis* vivent dans les mêmes conditions, mais sont beaucoup plus rares.

3) Il est une espèce que nous n'avons rencontrée que dans les villes d'Alger et de Mustapha, c'est le *Siegyomyia fasciata*. Ses larves vivent dans les moindres collections d'eau citadines. Nous en avons trouvé dans les quelques gouttes d'eau qui restaient au fond d'un pot de fleurs sur un balcon, dans le pot à eau d'un cabinet de toilette.

Leurs adultes sont les moustiques les plus fréquents des appartements. Le *St. fasciata* étant considéré comme capable de transmettre le virus de la fièvre jaune, il y a lieu de retenir le fait.

4) Les larves d'*A. maculipennis*, d'*A. Algeriensis*, de *C. fatigans* ont le même habitat, où on les rencontre souvent réunies. Leurs gîtes s'échelonnent, de façon frappante, le long des vallées qui descendent du massif de la Bouzaréa, et à partir des sources mêmes (300 mètres d'altitude).

Les *Anopheles* ont été recueillis dans 13 localités sur 29, que nous avons explorées. Sur ces 13 localités possédant des *Anopheles*, 6 jouissent d'une réputation incontestée de salubrité au point de vue paludisme. Ces 6 localités sans fièvre et avec *Anopheles* sont aux altitudes respectives de 350 mètres, 300 mètres, 270 mètres, 220 mètres, 190 mètres, 150 mètres.

Les 7 localités fiévreuses et avec *Anopheles* sont aux altitudes

respectives de 180 mètres, 120 mètres, 100 mètres, 93 mètres, 20 mètres, 15 mètres, 4 mètres ¹.

Conclusions. — Parmi les espèces de moustiques capturées dans les environs d'Alger, deux appartiennent au genre *Anopheles* propagateur du paludisme.

Une autre, le *Stegomyia fasciata* est l'espèce qui a été reconnue capable de transmettre la fièvre jaune.

Enfin, le *Culex fatigans* est un des moustiques qui peuvent être les hôtes dangereux de la Filaire du sang.

1. Nous remercions vivement M. le Dr Bordo, de Chéragas, pour les renseignements cliniques qu'il nous a fournis, au sujet du paludisme du Sahel algérien, question pour laquelle il a une compétence toute particulière.

EXPLICATION DES FIGURES

-
1. Œuf d'*Anopheles Algeriensis* (vu de face).
 2. — — — — — (vu de profil).
 3.)
 4.) Différentes formes des soies médianes et angulaires de la tête des larves
 5.) d'*A. Algeriensis* (dessinées d'un seul côté).
 6.)
 7. Aile d'*An. algeriensis*. (Schéma.)
 8. Ecailles des nervures des ailes d'*An. algeriensis*.
 9. Ecailles des nervures des ailes *An. bifurcatus*.
 10. Aile de *Culex Mariæ*.
 11. Ongles des pattes de *Culex Mariæ*, mâle et femelle.
 12. Siphon respiratoire de la larve de *Culex Mariæ*.
 13. Face supérieure de l'abdomen de *Culex Sergentii*, femelle.
 14. Face latérale de l'abdomen du même.
-

RÉSUMÉ DU RAPPORT SUR LA CAMPAGNE ANTIPALUDIQUE

organisée en 1902 à la gare de l'Alma (Est-Algérien.)

PAR MM. EDMOND SERGENT ET ÉTIENNE SERGENT

Le paludisme est, encore aujourd'hui, le principal obstacle à l'essor de la colonisation et à la mise en valeur de l'Algérie. De grands travaux de drainage ont assaini certaines régions ; mais ces ouvrages coûteux n'ont pu être exécutés que sur des points limités. D'autre part, si l'on étudie, de près, l'histoire de quelques villages, on aboutit à cette conclusion que le progrès de la civilisation n'entraîne pas toujours un abaissement dans la morbidité paludéenne. Nous connaissons des localités autrefois salubres où l'endémie palustre s'est implantée récemment, alors qu'une ère de prospérité semblait devoir récompenser les efforts des travailleurs. Cela tient sans doute à ce que le principal soin du colon, partout où il s'établit, est de se procurer de l'eau en abondance, de l'accumuler pour la saison sèche ; il crée ainsi des milieux de culture pour les larves des *Anopheles*, propagateurs du paludisme.

Il était intéressant d'expérimenter en Algérie les nouvelles mesures prophylactiques du paludisme, basées sur la défense contre les moustiques. Il fallait, pour obtenir une expérience précise, opérer sur un territoire restreint, réunissant les conditions nécessaires à l'application rigoureuse de ces mesures, et à la constatation de leurs résultats.

Grâce à M. le Dr Stéphan, médecin en chef, et à M. Mayer, directeur de la Compagnie de chemins de fer de l'Est-Algérien, que nous remercions vivement pour toutes les facilités qui nous ont été données, nous avons pu mettre en défense contre les *Anopheles* une des gares les plus éprouvées de tout le réseau par le paludisme, la gare de l'Alma, sur la ligne d'Alger à Constantine, à 38^{km}, 600 d'Alger.

Cette gare est située dans la plaine de la Mitidja, au pied des premiers contreforts de l'Atlas, au fond de la vallée de l'oued Boudouaou, large de 600 mètres environ, que la voie traverse

perpendiculairement. Il n'y a pas de remblais, de sorte que la voie présente de chaque côté de la gare deux rampes rapides pour remonter les flancs de la vallée. Ceux-ci atteignent 30 à 35 mètres d'altitude, tandis que la gare, dans le bas-fond, est à 15 mètres seulement. La vallée est dirigée sensiblement dans la direction sud-nord, et renferme, à 1,800 mètres en amont (au sud) de la gare, le village de l'Alma; elle aboutit à la mer, à 3 ou 4 kilomètres au nord. Dans cette vallée, à 200 mètres à l'est de la gare, coule l'oued Boudouaou sur un lit de galets, sans végétation fluviale, torrent en hiver, ruisseau en été. A 300 mètres à l'ouest de la gare, et parallèlement à l'oued, a été creusé de main d'homme un canal d'irrigation, qui provient du grand barrage du Fondouck, situé à une dizaine de kilomètres en amont. Ce canal reçoit de l'eau jusqu'en octobre, époque à laquelle on ferme le barrage, mais alors les pluies surviennent. Il contient donc constamment de l'eau. Il est large de 1 à 2 mètres, d'une profondeur variant de 50 centimètres à 1 mètre. Il n'y a presque pas de courant, et il y pousse une végétation luxuriante, qui nourrit une faune très abondante. L'eau potable est apportée à la gare de l'Alma, par des trains, de la gare de Ménerville, salubre, située plus loin sur la ligne. Il y a de plus un puits non couvert chez la garde-barrière. La gare est enfouie dans un petit bois d'eucalyptus qui en ont desséché les abords immédiats. Les arbres d'autres essences sont rares dans les environs. Dans la vallée, en amont et en aval, s'étendent des cultures de céréales et des vignobles. Près de la gare s'élève une ferme isolée, habitée par la famille N.

Durant notre expérience, la gare était occupée par 13 personnes, dont 9 y étaient installées depuis plus d'un an et étaient toutes impaludées; 4 étaient arrivées durant l'hiver, n'ayant jamais eu les fièvres.

Les voisins de la gare, non compris dans l'expérience, étaient un homme d'équipe indigène qui logeait avec sa femme et ses deux enfants dans un gourbi, sorte de cahute ouverte à tous les vents. Dans le sang de ces enfants, nous avons trouvé, pendant l'été, l'hématozoaire de Laveran en dehors de tout état fébrile. Pour le moment, nous avons renoncé à essayer de défendre ces indigènes très arriérés.

La ferme dont nous avons parlé était habitée par un colon,

ancien légionnaire, sa femme et un enfant en bas âge. Un autre enfant leur naquit en été 1902, au moment de l'expérience. Ce colon refusa l'offre que nous lui fîmes d'installer chez lui les mesures de défense prises à la gare.

Il faut remarquer que ces voisins de la gare, tous paludéens, constituaient des sources d'infection inaccessibles, où les *Anopheles* pouvaient venir s'infecter.

Ces mauvaises conditions augmentaient donc les difficultés de la prophylaxie.

*
*
*

Les méthodes de prophylaxie du paludisme peuvent se diviser, à l'heure actuelle, en 3 catégories :

1) Traitement préventif par la quinine des malades dont le sang contient l'hématozoaire, et qui sont ainsi des sources d'infection ;

2) Protection contre les piqûres d'*Anopheles* adultes ;

3) Destruction de ces moustiques à l'état larvaire.

1^o *Traitement préventif par la quinine.* — La Compagnie de l'Est-Algérien a fait le nécessaire depuis longtemps : sur simple demande des agents, le chef de gare leur livre gratuitement de la quinine en paquets ou en comprimés. Des circulaires rappellent aux employés l'importance de cette médication.

Nous nous sommes donc occupés des deux autres modes de défense.

2^o *Moyens mécaniques de protection contre les piqûres des ANOPHELES.*

A. *Défense individuelle.* — Les moustiquaires pour lits ne sont pas employés à cause de leur fragilité relative, qui les rend plus dangereux, une fois avariés.

Nous avons muni les agents d'un casque en moelle de sureau dont les larges bords supportent une voilette cylindrique de tulle portant deux coulisses ; la supérieure se serre autour du casque, l'inférieure sous le col rabattu du veston. Les larges bords du casque tiennent le tulle à bonne distance de la peau. Les employés ont chacun deux paires de gants de gros fil, qu'ils doivent mettre l'une sur l'autre. On leur recommande de fermer par un élastique le bas de leur pantalon.

Malheureusement, l'emploi de ces voilettes et des gants a été

fort négligé par les agents, comme nous avons pu nous en assurer.

B. Défense des habitations. — Le principe en est basé sur l'obturation de toute ouverture par une toile en fil de fer galvanisé dont la maille mesure 1^{mm},5 de côté.

Ainsi, la porte de bois préexistante est doublée par un châssis formé d'un cadre de bois couvert de toile métallique et attaché au mur par deux charnières. Ce châssis est maintenu fermé par un ressort. Certaines portes munies d'une sorte de perron ont permis de construire un tambour, une cage de toile métallique, s'ouvrant d'un côté dans l'appartement par la porte de bois, de l'autre côté sur le dehors par un châssis comme ceux qui doublent les autres portes.

On place un cadre garni de toile métallique entre la fenêtre et le volet en le fixant avec du plâtre. Une lucarne est ménagée au milieu de la toile métallique pour permettre d'ouvrir le volet. Cette lucarne est soigneusement fermée par un châssis ressemblant en petit à ceux qui doublent les portes.

Un carré de toile métallique est collé avec du plâtre à la partie supérieure des cheminées. Il sera très facile de l'enlever pour le remplacer, lorsque la suie aura bouché les mailles.

Les chiffres suivants indiquent le résultat dû à ces mesures.

La pose des grillages eut lieu le 26 juin. En 2 visites des chambres faites avant cette date (15 et 20 juin), c'est-à-dire au moment où les moustiques sont encore rares, 11 *Anopheles* femelles furent capturées (tous dans les chambres à coucher). En 15 visites faites après la pose des grillages, du 4 juillet au 11 novembre, c'est-à-dire à l'époque où les moustiques sont le plus abondants, 10 *Anopheles* femelles seulement sont trouvés. Elles étaient toutes dans le bureau du chef de gare et la buvette, pièces ouvertes à tout instant au moment du passage des trains. Aucune ne fut capturée dans les chambres à coucher.

3° Destruction des larves d'ANOPHELES.

Nous nous sommes servis dans ce but du pétrole ordinaire, répandu à la surface de l'eau. Dans les environs de la gare, le principal gîte des larves d'*Anopheles* était un canal d'irrigation couvert de végétation. Nous faisons faucher ces plantes et nous versions le pétrole dans la proportion de 10 à 20 cm. par mètre carré d'eau. L'eau du canal était ensuite bien brassée

pour favoriser l'étalement du pétrole. Les pétrolages qu'on effectuait aussitôt qu'une pêche révélait la présence de jeunes larves dans l'eau ont dû être répétés toutes les trois semaines ou tous les 15 jours (au mois de septembre tous les 8 jours). Leur résultat est représenté par les chiffres suivants :

Avant la campagne, il y eut 2 pêches (20 et 22 juin), c'est-à-dire à un moment où les moustiques sont encore rares; les 2 coups de filet les plus fructueux donnèrent 25 larves ou nymphes d'*Anopheles*.

Pendant la campagne (26 juin au 11 novembre), c'est-à-dire à l'époque où les moustiques sont le plus abondants, il y eut 14 pêches : les 14 coups de filet les plus fructueux donnèrent 14 larves ou nymphes¹.

Résultat sur la santé du personnel.

La gare de l'Alma était l'une des gares du réseau le plus éprouvées par les fièvres paludéennes. Du 1^{er} juillet 1894 au 1^{er} décembre 1901, 9 agents ont rempli les fonctions de chef ou de sous-chef de gare. Tous y ont contractés le paludisme, dès la première année de leur séjour; 8 d'entre eux ont dû être changés de poste, « pour cause de paludisme, sur avis du médecin ». Le 9^e, le chef de gare actuel, est gravement impaludé depuis la 1^{re} année de son séjour (1898) et a eu tous les ans des accès de plus en plus violents.

Le 16 juin, date à laquelle a commencé la campagne, 13 personnes habitent la gare. Parmi elles, 9 y sont installées depuis plus d'un an et sont impaludées, 4 sont arrivées durant l'hiver 1901-1902, n'ayant jamais eu les fièvres. *Ces quatre personnes ont passé l'été et l'automne 1902 sans présenter aucun symptôme de paludisme.* Parmi les anciens impaludés, presque tous ont eu quelques accès, attribuables à leur infection antérieure. Le chef de gare, qui avait tous les ans son 1^{er} accès estival vers le 1^{er} juillet, ne l'a eu cette année que le 20 août.

Des sujets non protégés, pouvant servir de « témoins » pour notre expérience, nous sont fournis par les seuls voisins de la

1. Du 26 juin au 11 novembre, 14 pêches pratiquées dans une autre localité non pétrolée de la même région nous fournirent (aux 14 coups de filet les plus fructueux) 220 larves environ. La différence entre ces nombres de 14 larves pour l'Alma, et de 220 larves pour la localité témoin, donne une idée de l'effet du pétrolage.

gare, la famille N., qui avait refusé nos toiles métalliques. Ils entraient tous, le 15 septembre 1902, à l'hôpital de Mustapha, avec le même diagnostic : « fièvres paludéennes ».

CONCLUSION. — En résumé, le pétrolage du canal et la pose des toiles métalliques ont diminué d'une façon évidente le nombre d'*Anopheles*¹ trouvés dans les chambres, et, par suite, restreint le nombre des chances d'infection ou de réinfection pour les habitants de la gare.

Les quatre nouveaux venus dans la gare n'y ont pas contracté le paludisme. C'est la première fois que des personnes passent un été en ce lieu sans y prendre les fièvres.

Evidemment, c'est là une expérience restreinte, mais nous ferons remarquer qu'elle en est d'autant plus précise. Nous espérons la reprendre l'année prochaine sur une plus grande échelle, grâce à M. Mayer, directeur de la Compagnie de l'Est-Algérien, qui a décidé de faire établir dans plusieurs autres gares les moyens de défense expérimentés à l'Alma.

1. Les *Anopheles* capturés à l'Alma appartiennent à l'espèce *A. maculipennis* (Meigen) et à une espèce nouvelle *A. Algeriensis* (Theobald). Les *Culex* trouvés sont de l'espèce *C. pipiens* (Linné) ou d'une espèce nouvelle, *C. Sergentii* (Theobald) ou de l'espèce *C. fatigans* (Wiedemann).

Ces moustiques feront l'objet d'une étude spéciale.

MÉTHODE D'HYDROLYSE DES PROTOPLASMIDES

PAR M. A. ÉTARD

I

Difficultés des travaux biologiques. — La cellule vivante qui a pris un si grand rôle n'est pas une sorte d'entité, de pièce identique dont les accommodations amènent la variété dans la série des êtres. Les groupements chimiques diffèrent d'une espèce à l'autre, d'un tissu à l'autre, de l'état normal à l'état pathologique. Pour cette raison, il est nécessaire de poursuivre cette sorte de dissection chimique des tissus qui a occupé Schützemberger, puis Fischer et Kossel. Ces travaux sont dignes de tenter les chimistes. Ils sont à la vérité d'une grande difficulté.

Les produits biologiques sont des plus décevants, qu'ils viennent d'hydrolyses ou des sérums. Ce sont des sirops de bel aspect, incristallisables, indéfiniment solubles dans l'eau et tout à fait insolubles dans les solvants carbonés. Ils ne laissent pas prévoir de fractionnement possible ou d'action partielle qui les sépare. On serait en moins mauvaise posture devant un sirop limpide qui contiendrait à la fois tous les pentoses, hexoses et heptoses connus. Cela a une apparence simple, donne des réactions générales et même des analyses moyennes satisfaisantes. Il faut seulement se dire qu'il n'y a pas une solution dans l'eau, mais une multitude de solutions qui se retiennent les unes les autres, et où aucun corps n'a sa solubilité propre ni ses constantes tant qu'on ne l'a pas séparé. Il en est à peu près de même pour les réactifs qui n'ont pas d'action ou précipitent à la fois tous ces corps analogues.

Un second point nous prive d'une idée d'ensemble sur les albuminoïdes, les peptones, les sérums. C'est la fonction variable de l'être ou du tissu qui les engendre. Les spermes de poissons, les embryons végétaux, tout ce qui a une fonction temporaire à évolution rapide a permis à l'Ecole biologique allemande de découvrir des protamines et des bases hexoniques. Il se peut

qu'on retrouve ces racines chimiques dans des tissus permanents, comme on trouve tant d'autres survivances héréditaires. Mais il est douteux que cela donne une vue juste de la masse des tissus vivants en équilibre stable, tels que les tendons, les os, les muscles, etc.

II

Recherches des racines chimiques des tissus. — On a rarement tenté l'oxydation des protoplasmides, car il en revient peu de chose : la substance se détruit. Cela semble indiquer que dans la matière vivante prédominent les chaînes linéaires azotées ou oxyazotées, mais de structure analogue aux sucres qui se déviennent complètement. Si à l'état initial il y avait là une proportion notable de dérivés phénylques ou pyridiques, ils ne seraient pas comburés, et apparaîtraient sous des formes substituées connues.

Pour cette raison, plus ou moins consciente, et surtout parce que cela réussit, on a fait jusqu'à présent de l'hydrolyse et comblé les points faibles des formules par de l'eau, sans toucher au substratum profond des groupes biologiques.

Toutes les hydrolyses par acides ou bases sont recommandables dans des conditions déterminées.

Depuis quelques années on a renoncé au réactif de l'inventeur de l'hydrolyse : Braconnot (1820).

L'acide sulfurique charbonnerait facilement la matière, ce qui est une preuve d'énergie, et par contradiction les ions de l'acide chlorhydrique seraient les plus forts connus. C'est là plutôt une vue de théoricien, et le chimiste qui connaît la matière choisit les ions convenables là où ils se trouvent.

Dans le domaine de chimie biologique de l'Institut Pasteur, je me suis occupé entre autres choses de la conduite des hydrolyses, et voici quelques observations sur ce sujet.

Les ions chlorhydriques ne sont peut-être pas dénués d'une perfection théorique, mais pratiquement cet acide ne se manie que dans du verre, ce qui exclut l'usage de grandes masses.

Après une hydrolyse chlorhydrique, on doit subir la présence gênante du chlore ou des chlorures. Pour les éliminer, il faut faire intervenir l'argent, qui n'enlève le chlore que dans un précipité insoluble chargé de matières d'hydrolyse entraînées, qu'il n'est plus aisé de faire revenir au jour.

L'idéal est de chasser totalement du champ d'expérience toutes les choses accessoires sans passer par des précipités insolubles.

Dans cet esprit, le plus commode est de revenir à l'hydrolyse sulfurique, convenablement étudiée. J'ai constitué un hydrolyseur avec un cylindre de tôle d'acier de 100 litres, garni d'une épaisse feuille de plomb à soudure autogène. (Fig. I.)

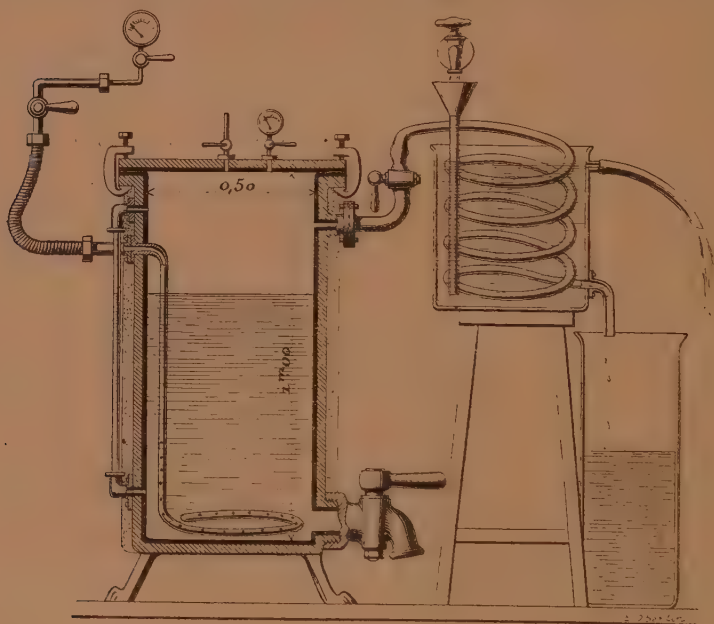


Fig. 1.

Un couvercle également revêtu de plomb, serré par des serre-joints, assure l'étanchéité. La vapeur sous pression arrive par les trous d'un serpentin.

Une couche calorifuge couvre l'extérieur et permet de marcher en calorimètre à 140°. Les accessoires de niveau, de remplissage et de mesure sont représentés par le dessin ci-joint, exécuté d'après mon modèle.

En marche normale, cet appareil peut recevoir :

Muscle frais cuit et pressé 30^k. (Renfermant 15^k de sec.

Acide sulfurique à 64° B. 15^k.

L'état initial est donc :

Protoplasme supposé sec. Soit en 0/0 30 0/0.

SO⁴H² dans la masse 15^k. Soit en 0/0 30 0/0.

Eau servant à éteindre SO⁴H² 5^k + eau du tissu 40 0/0.

Le volume est alors 50 litres.

L'apport de vapeur chaude provoque la liquéfaction hydrolytique, et après 8 heures l'état final aboutit à la composition suivante :

Eau.....	72 0 0
SO ⁴ H ² 0/0 dans la masse.....	14 0/0
Albuminoïde supposé sec (mais hydrolysé).....	14 0/0

Le volume est devenu 110 litres.

En d'autres termes, la concentration en SO⁴H² était au début de 30 0/0, elle n'est plus à la fin que 14 0/0.

Tel est le milieu hydrolysé final qu'il s'agit de traiter. Cet appareil permet d'obtenir de grandes quantités de matière transformée, déduction faite de quelques fibres non dissoutes et de la graisse facile à isoler.

L'acide sulfurique peut être éliminé exactement. Il suffirait de saturer par un excès de baryte, d'enlever à son tour la baryte par le gaz carbonique.

Mais on est loin de retrouver la matière organique engagée : une partie est définitivement perdue dans l'entraînement des précipités barytiques qui foment des laques.

Il faut éliminer les corps étrangers à l'état de cristaux solubles, se séparant purs et pouvant toujours, en cas de besoin, être redissous. Voici donc le nouveau système que j'ai employé :

La masse d'hydrolyse sulfurique finale est saturée exactement par de l'ammoniaque, filtrée et évaporée; le sulfate d'ammonium, tant qu'il s'en dépose est simplement lavé avec

ses eaux mères : il se comporte ainsi comme un sel insoluble ; grâce à ce moyen imparfait, la tyrosine et la leucine suivent au moins en très grande partie les sels impurs. Avec quelque pratique, on les séparera de là en éliminant à l'état pur le sel inutile, dont on doit retrouver le poids à titre de contrôle.

La concentration, poussée à l'état de sirop épais, laisse dans ces sirops 20 0/0 de sulfate. J'ai essayé d'enlever ce sel étranger à l'état de sulfate de nickel et d'ammonium, en ajoutant du sulfate de nickel ; mais dans ces milieux extrêmement complexes, on ne peut enlever plus du tiers du sulfate ammonique, et on introduit un peu de nickel à la place.

Une réaction rapide m'a permis d'obtenir la matière organique, sinon exempte de sulfate, au moins en parfait état pour la recherche ultérieure. Il suffit de délayer le sirop sulfaté épais dans un mélange à volumes égaux d'acide acétique cristallisable et d'alcool méthylique ; aussitôt le sulfate d'ammoniaque, facile à essorer, se précipite.

C'est un avantage de localiser temporairement une grande partie de la tyrosine et de la leucine dans un dépôt soluble. Cela diminue d'autant la complexité des matériaux hydrolysés, où s'accumulent entre autres choses le glyocolle, l'acide glutamique et des bases.

Le fait d'avoir renoncé à un précipité complètement insoluble n'a que des avantages, car après ce travail préliminaire, que tous les systèmes exigent, les séparations de chimie minutieuse se font dans des conditions où le sulfate disparaît tout à fait.

Ayant déjà montré que l'hydrolyse, par les alcalis sous pression, amène les corps biologiques les mieux connus à des états limites, on ne peut employer ce procédé pour se faire une idée de la constitution des protoplasmides.

OBSERVATIONS

A propos du mémoire de MM. TISSIER et MARTELLY

PAR M. PIERRE ACHALME

Lorsqu'en septembre dernier, je publiai dans ces *Annales* un mémoire sur les difficultés de détermination de certains microbes anaérobies, et sur l'utilité que pouvait présenter pour arriver à ce but l'étude de leurs fonctions chimiques, spécialement en ce qui concerne la fermentation des hydrates de carbone, je ne pensais pas trouver dans ce recueil même une confirmation de ces idées aussi absolue que celle que vient involontairement apporter le travail paru dans le numéro de décembre, sous la signature de MM. Tissier et Martelly.

Ces savants en effet, partis d'un point de départ différent, ont été amenés à étudier des microorganismes très voisins de ceux qui ont fait l'objet de mes recherches, et l'insuffisance de leur technique les a conduits à des confusions si évidentes qu'elles démontrent péremptoirement l'utilité du fil conducteur que j'ai cherché à dégager de dix années d'études.

Grâce à lui, il est possible de se convaincre facilement que les auteurs de ce mémoire ont décrit, sous le nom de *bacillus putrificus coli* (Bienstock), un microbe différent de celui isolé par ce savant. J'ai, en effet, opéré avec un bacille venant de Bienstock lui-même, et conservé dans la collection de l'Institut Pasteur. Ce microbe faisant fermenter d'une manière constante le glycose et le maltose, il est clair que l'on ne saurait établir, sur des caractères essentiellement instables, une identification avec cette espèce, d'un microbe ne possédant pas ces propriétés fermentatives. Le nom de *bacillus putrificus coli* (Bienstock) pourrait au contraire beaucoup mieux s'appliquer au bacille que MM. Tissier et Martelly décrivent comme nouveau sous le nom, mal choisi du reste, de *bacillus bifementans sporogenes*, bien que l'insuffisance de l'étude en rende la détermination exacte difficile.

Je pourrais être plus affirmatif si les auteurs du mémoire précité ne s'étaient pas montrés aussi avarés de détails au sujet

de la technique suivie par eux. Quoi qu'il en soit, en employant celle que j'ai décrite, ils pourront se convaincre, entre autres choses, que le bacille tétanique, en culture pure, ne se différencie nullement du *putrificus* et des autres microbes du groupe par « la sécrétion d'une diastase peu active sur les substances albuminoïdes et les protéides », mais qu'au contraire il produit une trypsine extrêmement puissante.

Je serai également désireux de connaître le procédé grâce auquel MM. Tissier et Martelly ont pu affirmer la sécrétion de lipase par les bacilles qu'ils ont étudiés. Tout en réservant la question, encore insuffisamment éclaircie, de l'action de la lipase sur les graisses, je n'ai obtenu aucun résultat par des recherches faites au moyen de la monobutyryne, et la lecture du mémoire précité ne suffit pas à convaincre — loin de là — que les auteurs se sont mis à l'abri de la cause d'erreur provenant de la saponification due à l'ammoniaque formée dans la fermentation des matières azotées.

Au sujet de la bibliographie, je ne saurais qu'exprimer mes regrets de ce que MM. Tissier et Martelly aient cru devoir prendre si tardivement connaissance de mon mémoire paru en septembre dernier. Cela leur eût épargné une erreur chronologique, qu'ils regrettent certainement, en attribuant à Fränkel la première détermination du bacille que j'ai décrit en 1891, et qui prend une importance de plus en plus grande dans la pathologie humaine, sous les noms de *bacillus emphysematosus*, *bacillus enteritidis sporogenes*, *bacillus perfringens*, etc. Cette multiplicité de noms plus sonores que significatifs, (le bacille en question ne dégaseant de gaz abondants que dans certaines conditions et ayant une sporulation plutôt difficile) n'est pas faite, en effet, pour simplifier un sujet déjà assez compliqué par lui-même; aussi le but de mon mémoire était-il de lui donner un état civil définitif, en le différenciant de ses proches parents appartenant au même groupe biologique.